

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Biochemische Darstellung  
funktionaler Proteome und großer  
Proteinkomplexe

von  
Erik Blazek  
aus Wolfenbüttel  
2005

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Meisterernst betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 17.12.2004



Erik Blazek

Dissertation eingereicht am 17.12.2004

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Michael Meisterernst

2. Berichterstatter: Professor Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am 22. Februar 2005

# **DANKSAGUNGEN**

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Meisterernst sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen fachlichen Anregungen in dieser Zeit. Insbesondere habe ich den wissenschaftlichen Freiraum geschätzt, der es mir ermöglichte, eigene Ideen umzusetzen und fortzuführen.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten und den Vorsitz in der Prüfungskommission zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung monoklonaler Antikörper als wesentlicher Teil meines Projektes.

Frau Gabriele Gembe, GSF danke ich für die exzellente technische Unterstützung bei fast allen Experimenten dieser Arbeit und eine angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Jens Tampe, Ascenion danke ich für die Hilfestellung bei der Anmeldung des Importin-Fusionsproteins zum Patent und für die anschließende Vermarktung.

Den Mitgliedern der AG Meisterernst danke ich für ein freundliches Arbeitsklima, Unterstützung bei Experimenten sowie gemeinsame Freizeitgestaltung.

Meinen Eltern schließlich gebührt viel Dank für ihren unerschütterlichen Glauben an eine solide Ausbildung und die vielfältige Unterstützung während der Jahre.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis Dezember 2004 im Labor von PD Dr. Michael Meisterernst am Genzentrum der LMU und am Hämatologikum der GSF in München angefertigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen angefertigt:

Erik Blazek, Gerhard Mittler und Michael Meisterernst (2005)

The Mediator of RNA polymerase II.

Chromosoma (2005) Feb 3

Erik Blazek und Michael Meisterernst (2004)

Visualization of a nuclear subproteome by far-Western blot with derepressed importin alpha.

(eingereicht)

Erik Blazek und Michael Meisterernst (2003)

Importin alpha mit inaktivierter autoinhibitorischer Domäne zur Diagnose.

Patentanmeldung DE10319073

Erik Blazek, S. Wasmer, U. Kruse, A. Aronheim, M. Aoki, P.K. Vogt (2003)

Partial oncogenic transformation of chicken embryo fibroblasts by Jun dimerization protein 2, a negative regulator of TRE- and CRE-dependent transcription.

Oncogene. Apr.10;22(14):2151-9

# Abkürzungen

Aa	Aminosäure (amino acid)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARC	<i>Activator recruited cofactor</i>
Arm	Armadillo ( <i>repeat</i> )
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAF	<i>Brg-1/Brm-associated factor</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-4-Indolylphosphat
B-Med	Mediator-Komplex mit basaler Funktion
bp	Basenpaare
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
cDNA	Zur mRNA komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
<i>C. elegans</i>	Fadenwurm ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )
CRSP	<i>Cofactor required for Sp1</i>
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
CTD	C-terminale Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	Taufliege ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPE	<i>Downstream promoter element</i>
DRIP	<i>Vitamin D receptor interacting proteins</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EM	Elektronenmikroskopie
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
fmol	Femtomol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMG	<i>high mobility group</i>

---

HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IBB	Importin- $\beta$ -bindende Domäne
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
Inr	Initiator-Element
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
Jurkat	menschliche T-Zelllinie
kb	Kilobasenpaare
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LB	<i>Luria-Bertani (Broth)</i>
M	Mol pro Liter (Molar)
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i> (Massenspektrometrie)
MAR	<i>Matrix attachment region</i>
MED__	Untereinheit des Mediator-Komplexes
MeOH	Methanol
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
Mw.	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
NAT	<i>Negative factor for activated transcription</i>
NBT	Nitroblautetrazolium
NC	Negativer Cofaktor
NES	Kernexportsignal ( <i>nuclear export sequence</i> )
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization sequence</i> )
nM	Nanomolar
NPC	Kernporenkomplex ( <i>nuclear pore complex</i> )
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
OD	Optische Dichte
OMG	3'-O-Methylguanosin
<sup>32</sup> P	Phosphor-32
P11	Phosphocellulose P11
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAQ	PC2-assoziiertes Q-reiches Protein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PC	Positiver Cofaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHA	Phytohemagglutinin
PIC	Präinitiationskomplex ( <i>pre-initiation complex</i> )
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmol	Picomol

Pol II	RNA Polymerase II
ppm	<i>parts per million</i>
PTL	Primäre T-Lymphocyten
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<sup>35</sup> S	Schwefel-35
SAR	<i>Scaffold-associated region</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Bäckerhefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
<i>S. pombe</i>	Spalthefe ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SMCC	<i>Srb/Mediator containing complex</i>
snRNA	Kleine kernlokalisierte RNA (small nuclear RNA)
Srb	<i>Suppressor of RNA polymerase II subunit B mutation</i>
SV	Säulenvolumen, - volumina
SV40	Simian virus 40
SWI/SNF	<i>Imitation switch / Sucrose non-fermenting</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAF	TBP-assoziiierter Faktor (der Klasse II-Transkription)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TE	Tris-EDTA Puffer
TFII	Transkriptionsfaktor der Klasse II-Transkription
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoro acetic acid</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFTC	TBP-free TAF-containing complex
Tm	minimale Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl-chloromethylketon
TRAP	<i>Thyroid hormone associated proteins</i>
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit (unit)
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
USA	<i>Upstream factor stimulatory activity</i>
ÜN	Über Nacht
USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP16	Virion protein 16
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung ( <i>weight per volume</i> )

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>I</b>
1.1	Proteinexpression in Eukaryonten.....	1
1.2	Transkription .....	1
1.3	Struktur proteinkodierender Gene .....	3
1.4	Aufbau des Präinitiationskomplexes und Initiation der Transkription .....	4
1.5	Elongation und RNA-Prozessierung .....	6
1.6	Transkriptionelle Regulation.....	6
1.7	Transkriptionscofaktoren .....	7
1.8	Der Mediator-Komplex .....	8
1.8.1	Entdeckung und Isolierung der Mediator-Komplexe.....	8
1.8.2	Komposition und evolutionäre Konservierung der Mediator-Komplexe .....	9
1.8.3	Die Rolle des Mediators in Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation .....	11
1.8.4	Mechanismen des Mediators in der Transkription.....	13
1.8.5	Funktionen der „kleinen“ Mediator-Komplex in basaler und aktivierter Transkription .....	13
1.8.6	Kinase-Modul und Regulation von TFIID .....	14
1.9	Transkription im Chromatin.....	15
1.9.1	Posttranslationale Modifikationen der Histone .....	15
1.9.2	Chromatin-Umformungskomplexe .....	16
1.10	Nukleo-cytoplasmatischer Transport von Proteinen .....	18
1.10.1	Regulation von Zellkernimport und -export.....	20
1.11	Ausgangssituation und Fragestellung.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1	Geräte und Hilfsmittel.....	22
2.2	Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial .....	23
2.3	Chemikalien und Biochemikalien .....	24
2.4	Lösungen und Puffer .....	27
2.5	Enzyme.....	28
2.6	Plasmide .....	28
2.7	Peptide.....	29
2.8	Bakterienstämme .....	29



	Inhalt	IX
2.9	Eukaryotische Zelllinien .....	29
2.10	Antikörper .....	30
2.10.1	Primärantikörper.....	30
2.10.2	Sekundärantikörper .....	30
2.11	Längenstandards.....	31
2.11.1	DNA-Größenstandards.....	31
2.11.2	Protein- und Peptid-Molekulargewichtsmarker .....	31
2.12	Prokaryotische Zellkultur .....	32
2.12.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	32
2.13	Eukaryotische Zellkultur .....	33
2.13.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	33
2.13.2	Isolierung primärer T-Lymphocyten.....	33
2.13.3	Stimulierung primärer T-Lymphocyten .....	34
2.14	Zellfraktionierung.....	34
2.14.1	Jurkat und RCC-Kernextrakte (NAM-Protokoll).....	34
2.14.2	Fraktionierung von Hela-Zellen .....	37
2.15	Chromatographie.....	38
2.15.1	Umgang mit Chromatographie-Säulenmaterialien und praktische Grundlagen der Affinitätschromatographie .....	38
2.15.2	Phosphocellulose-Säulenchromatographie.....	38
2.15.3	Immunaффinitätschromatographie .....	39
2.15.4	Heterologe Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> und Aufreinigung 41	
2.16	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	43
2.16.1	SDS-Gelelektrophorese .....	43
2.16.2	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
2.16.3	Gesamtproteinfärbung.....	46
2.16.4	Western Blot.....	47
2.16.5	Peptidarrays.....	49
2.16.6	Far Western Analyse .....	49
2.16.7	Immunfluoreszenzfärbung .....	49
2.17	Proteinidentifizierung mittels MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie.....	50
2.17.1	Trypsin-Spaltung von Proteinen.....	51
2.17.2	Entsalzung von Peptiden mittels RP-Chromatographie im Mikromaßstab .....	51
2.17.3	Vorbereitung der Matrix und MALDI-Massenspektrometrie.....	52

	Inhalt	X
2.18	DNA-Klonierungstechniken.....	52
2.18.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	52
2.18.2	Amplifizierung von DNA mittels PCR.....	53
2.18.3	Restriktionsspaltung.....	54
2.18.4	Gelextraktion und DNA-Reinigung über Ionenaustauschersäulen.....	54
2.18.5	Phenolchloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren.....	54
2.18.6	Ligation.....	55
2.18.7	Transformation.....	55
2.18.8	Plasmid-DNA-Präparation.....	56
2.18.9	Kolonie-PCR.....	56
2.19	in-vitro-Transkription.....	57
2.19.1	Immundepletion von Kernextrakten für die <i>in-vitro</i> -Transkription.....	59
2.19.2	Verwendung von immobilisierten Komplexen in der <i>in-vitro</i> -Transkription..	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
3.1	Zellfraktionierung.....	61
3.2	Motivspezifische Antikörper.....	66
3.2.1	Polyprolin-Motivantikörper.....	68
3.2.2	Poly-(D/E)-Motivantikörper.....	69
3.2.3	Antikörper gegen das ATP-bindende Motiv von Kinasen.....	69
3.2.4	Differentielle Expression von Polyprolin und Poly-(D/E)-Proteinen in der T-Zell-Aktivierung.....	70
3.2.5	Aufreinigung von Proteinen mit Hilfe von Motivantikörpern.....	73
3.3	Detektion und Aufreinigung von Zellkernproteinen mittels Importin $\alpha$ .....	74
3.3.1	Spezifische Detektion von Kernproteinen im Far-Western-Blot.....	75
3.3.2	Differentiell exprimierte Kernproteine in primären T-Lymphocyten.....	78
3.3.3	Aufreinigung von NLS-Kernproteinen mittels GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N.....	82
3.3.4	Untersuchung des Negativen Cofaktors 2 (NC2) auf eine funktionale NLS ...	83
3.4	Proteinbiochemische Analyse des humanen Mediator-Komplexes.....	84
3.4.1	Erstellung einer zweidimensionalen Karte des Mediator-Komplexes.....	85
3.4.2	Assoziation des Mediator-Komplexes mit dem SWI/SNF-Komplex und Pol II	88
3.4.3	Signalabhängige Phosphorylierung von Mediator-Untereinheiten.....	90
3.4.4	Phosphozellulose-Chromatographie zur Anreicherung von Mediator-Subpopulationen.....	92

---

3.4.5	Aufreinigung des B-MED-Komplexes mittels MED15-Antikörpern und GST-CTD .....	93
3.4.6	Isolierung unterschiedlicher Mediator-Komplexe aus p11-Fraktionen .....	96
3.4.7	Mediator-Bindung an die RNA Polymerase II C-terminale Domäne ist unabhängig von MED26 / CRSP70 .....	98
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
4.1	Zellfraktionierung.....	99
4.2	Motivspezifische Antikörper.....	100
4.2.1	Herstellung von Motivantikörpern .....	100
4.2.2	Einsatz der Motivantikörper in vergleichender Proteomics .....	101
4.2.3	Polyprolin als Protein-Protein-Interaktionsmotiv .....	102
4.3	Kernproteinfärbung mit Importin $\alpha$ .....	103
4.4	Proteinexpression in der T-Zell-Aktivierung .....	105
4.5	Untersuchungen an humanen Mediator-Komplexen.....	105
4.5.1	Mediator und transkriptionelle Synergie.....	106
4.5.2	Mediator-Interaktionen mit RNA Polymerase II .....	107
4.5.3	Die Rolle des Kinase-Moduls in der Mediator-Funktion.....	109
4.5.4	Assoziation des Mediators mit dem SWI/SNF-Komplex .....	112
4.5.5	Proteinbiochemische Analyse von Mediator-Komplexen.....	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>132</b>
7.1	Aminosäuren-Tabelle (Ein- und Drei-Buchstaben-Code).....	132
7.2	Poly-(Aspartat/Glutamat)-Proteine im menschlichen Proteom.....	132
7.3	Polyprolin-Proteine im menschlichen Proteom.....	134
7.4	Spezifische Färbung von Zellkernproteinen mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N .....	135

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteinexpression in Eukaryonten

Proteine sind die grundlegenden Bausteine in den Zellen aller Lebewesen und leiten sich neben den Nukleinsäuren DNA und RNA als einzige Makromoleküle vom Genom der Zelle ab. So ist die Sequenzinformation eines Proteins durch jeweils ein Gen auf der DNA im Zellkern festgelegt. Durch den Prozeß der Transkription kann jedes der Gene in RNA umgeschrieben werden. Die sogenannte prä-mRNA wird an ihren Enden prozessiert und es werden informationslose Abschnitte durch Spleißen entfernt. Anschließend kann die so prozessierte mRNA (*messenger-RNA*) aus dem Zellkern transportiert werden und von den Ribosomen im Cytoplasma in Proteine translatiert werden bis sie schließlich durch Nukleasen abgebaut wird. Die mRNA ist also eine im Vergleich zur DNA kurzlebige „Anweisung“ zur Herstellung eines Proteins. Im Gegensatz zur DNA, die in ihrer Kopienzahl festgelegt ist, kann die Abundanz der gebildeten mRNAs in Abhängigkeit von Umweltbedingungen, Entwicklungsstadien und Gewebetypen mehrzelliger Organismen um mehrere Größenordnungen variieren und somit die strukturelle und funktionale Proteinzusammensetzung der Zelle bestimmen (Übersicht in Alberts 2004). Diese Art der Regulation ist ein grundlegender Prozeß in allen Lebewesen.

Um der hohen Komplexität mehrzelliger eukaryotischer Organismen gerecht zu werden, muss die transkriptionelle Regulation sehr präzise verlaufen und tatsächlich unterliegt sie der Kontrolle tausender Proteine, die von der Zellmembran ausgehend bis zur Transkriptionsmaschine im Kern ein komplexes regulatorisches Netzwerk bilden. Zusätzlich wird die Abundanz einer Proteinspezies noch unter anderem durch veränderliche Stabilität der mRNA, durch Proteinabbau und durch Beeinflussung der Translationsmaschine über Signalproteine reguliert. Aufgrund dieser posttranskriptionellen Regulation besteht nur eine schwache Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmengen. (Anderson und Seilhamer 1997).

## 1.2 Transkription

Der Prozeß der Transkription wird durch RNA-Polymerasen katalysiert. Sie entwinden dabei fortlaufend den DNA-Doppelstrang der Matrize und synthetisieren einen komplementären RNA-Strang. Hierzu wird ein wenige Nukleotide kurzes DNA-RNA-

Hybrid gebildet und im aktiven Zentrum des Enzyms Ribonukleotide an das 3'-OH-Ende der RNA angeheftet.

In Prokaryonten sowie in den Zellorganellen Mitochondrien und Chloroplasten ist eine Polymerase für die Transkription ausreichend. In den Zellkernen von Eukaryonten hingegen befinden sich drei verschiedene, komplexer aufgebaute RNA-Polymerasen. Sie sind bei ihrer Entdeckung gemäß ihrem Auftreten in einer chromatographischen Trennung mit den römischen Ziffern I-III bezeichnet worden. Pol I und Pol III transkribieren die RNA-Komponenten des Translationsapparates, die ribosomalen RNAs (rRNA) und die Transfer-RNAs (tRNA). Die RNAs des Spleißosoms (snRNA) werden von Pol II und Pol III hergestellt. Allein Pol II transkribiert proteinkodierende Gene. Pol II unterliegt daher auch der ausgeprägtesten Regulation und ist der zentrale Punkt des informationsverarbeitenden Systems der Zelle.

Alle eukaryotischen Polymerasen bestehen aus mindestens 12 Untereinheiten, im Falle der Pol II der Größe nach als Rpb1-12 bezeichnet. Nur drei Untereinheiten (Rpb4, -7, -9) sind spezifisch für Pol II. Vier Untereinheiten (Rpb1, -2, -3, -11) sind homolog zu den Untereinheiten der beiden anderen Polymerasen und die restlichen fünf (Rpb5, -6, -8, -10, -12) sind Bestandteil aller drei Polymerasen. Die beiden Untereinheiten Rpb4 und Rpb7 sind dabei dynamisch mit Pol II assoziiert und wahrscheinlich nur bei der Initiation der Transkription erforderlich.

Eine Besonderheit der Pol II ist die carboxy-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit Rpb1, die beim Menschen aus 52 Heptapeptid-Wiederholungen mit der Konsensus-Sequenz YSPTSPS besteht. Die genaue Zahl ist speziesabhängig, z.B. sind es bei *S. cerevisiae* nur 26/27 Wiederholungen. Die CTD wird im Verlauf der Transkription an Tyr1 und Ser2/Ser5 phosphoryliert und dient u.a. als Bindungsstelle für assoziierte Proteine, wie den Mediator-Komplex und RNA-prozessierende Enzyme. Sie spielt eine grundlegende Rolle für die Expression vieler Gene und ist daher für die Zelle essentiell (West und Corden 1995, Meininghaus und Eick 1999).

Die Sequenzhomologien zwischen den eukaryotischen Polymerasen von den Hefen bis zum Menschen sind sehr ausgeprägt. Darüber hinaus zeigt sowohl die Primärstruktur als auch die über Röntgenstrukturanalyse ermittelte Raumstruktur (geringe) Ähnlichkeiten zu bakteriellen Polymerasen (Allison et al. 1985, Sweetser et al. 1987, Darst 2001, Cramer 2002). Daraus folgt, daß sich die Struktur der RNA Polymerasen sehr früh in der Evolution entwickelt hat und sich die Aktivität der Polymerasen weitestgehend auf die grundlegende Reaktion der RNA-Synthese beschränkt. Die gegenüber Bakterien ungleich höheren Anforderungen an die transkriptionelle

Regulation in ein- und mehrzelligen Eukaryonten müssen offenbar durch eine Vielzahl zusätzlicher Faktoren bewältigt werden.

### 1.3 Struktur proteinkodierender Gene

Pol II und die kodierende Sequenz alleine sind für die Transkription proteinkodierender Gene nicht ausreichend. Der Transkriptionsstart ist vielmehr in externen Sequenzelementen festgelegt und die Polymerase benötigt zusätzliche Transkriptionsfaktoren zur Erkennung des Startpunktes. An dieser Stelle ergeben sich weitreichende Einflussmöglichkeiten von regulatorischen Sequenzen und spezifischen Transkriptionsfaktoren auf die Transkriptionsaktivität.

Die stromaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenzelemente nahe der transkribierten Sequenz werden als Promotor bezeichnet. Der zur Bindung der sogenannten basalen Transkriptionsmaschine notwendige Corepromotor (Minimalpromotor) besteht meist aus einer TATA-Box ca. 30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts, einer Bindestelle für den Transkriptionsfaktor TFIIB (BRE) und dem *Initiator*-Element (Inr), einer pyrimidinreichen Sequenz direkt am Transkriptionsstart (Abbildung 1-1 a). Bei vielen Genen befindet sich auch ein *Downstream-Promoter-Element* (DPE) ca. 30 Nukleotide unterhalb des Transkriptionsstarts (Übersicht in Butler und Kadonaga 2002, Kadonaga 2002). Nur wenige Promotoren weisen alle Elemente auf. Beispielsweise ersetzen bei Haushaltsgenen meist GC-Boxen die TATA-Box und gelegentlich auch das Inr-Element.

Zusätzlich zu diesen Elementen, die eine basale Transkription erlauben, befinden sich am Promotor regulierter Gene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die als Aktivatoren oder Repressoren wirken können. Unterschiedliche Bindungsstellen können innerhalb eines Promotors überlappen oder ähnliche Bindungsstellen in verschiedenen Promotoren durch Abweichungen von der Consensus-Sequenz unterschiedlich hohe Bindungseffizienzen erlauben. Daraus ergibt sich bereits ein Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten. Zudem können sich Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen auch Tausende von Basenpaaren entfernt (distal) vom Promotor befinden. Diese Elemente werden nach ihrer Wirkung als Enhancer oder Silencer bezeichnet. Sie können durch Schleifenbildung in der DNA in die Nähe des Promotors gelangen und die Regulationsmöglichkeiten an der räumlich begrenzten Promotorregion erweitern (Übersicht in Blackwood und Kadonaga 1998).

Die Effekte von Enhancern und Silencern sind weitestgehend unabhängig von Position und Orientierung, werden aber durch Elemente wie Insulatoren, Matrix-attachment-Regions (MAR) und Scaffold-associated-Regions (SAR) begrenzt, die Domänen im Chromatin ausbilden (Übersicht in Bode et al. 2003, Kuhn und Geyer 2003).

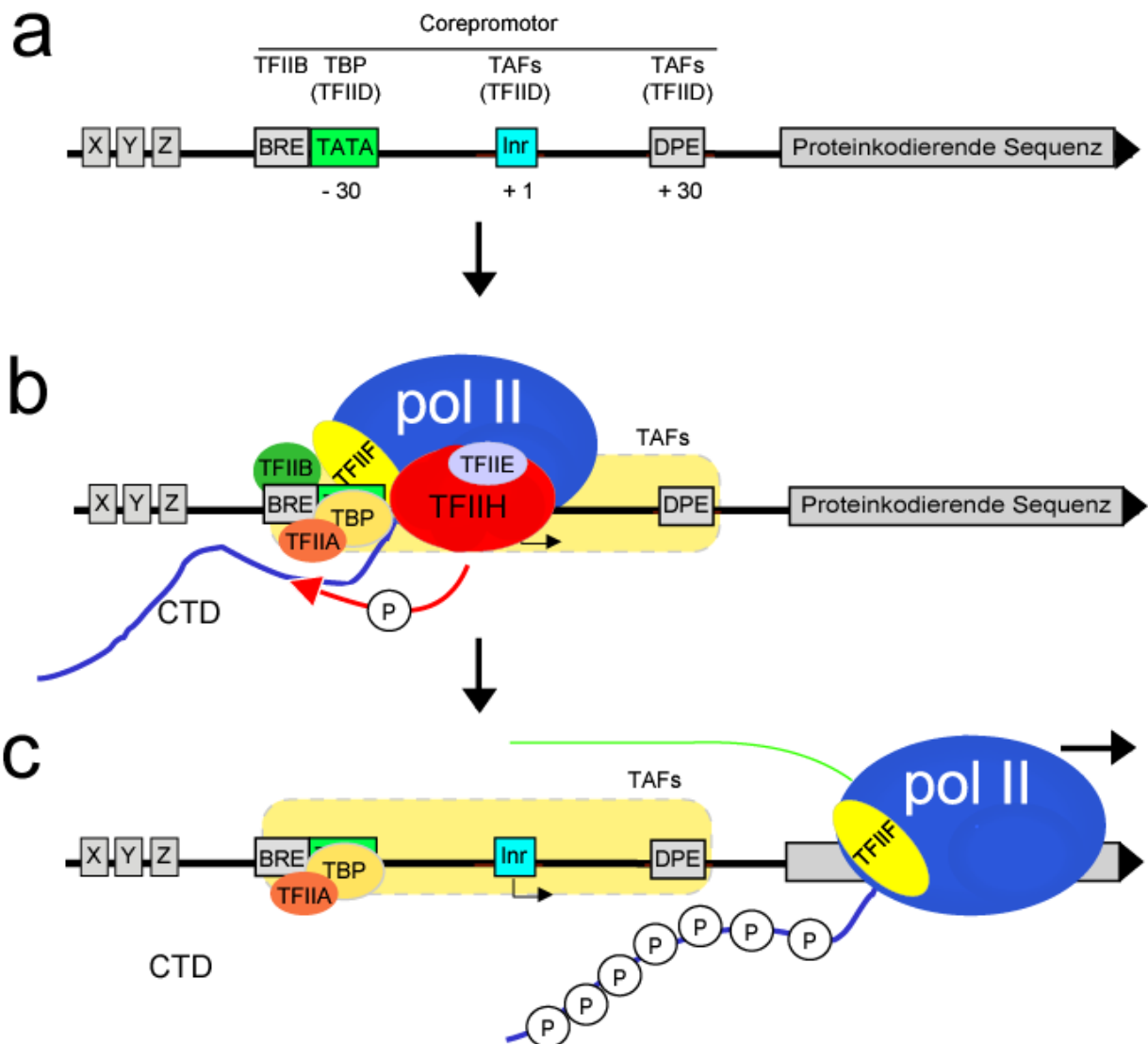
#### 1.4 Aufbau des Präinitiationskomplexes und Initiation der Transkription

Für die Bindung von Pol II an den Promotor sind Proteine bzw. Proteinkomplexe notwendig, die die verschiedenen Promotorelemente erkennen können, sogenannte Transkriptionsfaktoren. Diejenigen davon, die grundsätzlich für die Pol II Transkription erforderlich sind und eine basale d.h. eine nicht spezifisch aktivierte Transkription ermöglichen, werden als Generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) bezeichnet (Übersicht in Roeder 1996, Martinez 2002). Die GTFs umfassen sechs Proteinkomplexe, die aus über 30 Polypeptiden bestehen (Orphanides et al. 1996).

Das TATA-Bindeprotein TBP lagert sich an die TATA-Box des Promotors an und induziert eine erhebliche Verbiegung der DNA. TBP befindet sich dabei mit seinen assoziierten Faktoren (TAFs) in einem Komplex der als TFIID bezeichnet wird. Die TAFs sind von großer Bedeutung in der Transkription und sind jeweils für Gruppen von Genen zuständig. TAF1 beispielsweise kann unabhängig von TBP an Promotorelemente binden und somit die Erkennung TATA-freier Promotoren vermitteln. Darüber hinaus kann dieses Protein andere Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und Histone des Chromatins acetylieren (Dikstein et al. 1996, Mizzen et al. 1996).

Promotorgebundenen TFIID ermöglicht die Anlagerung der GTFs TFIIA und TFIIB an entgegengesetzte Enden von TFIID (Abbildung 1-1). Beide GTFs stabilisieren die Bindung von TFIID an den Promotor, verdrängen eventuelle negative Faktoren und schaffen eine Plattform für die Bindung der Polymerase. Für die Promotorbindung und Aktivierung der Pol II sind insbesondere TFIIB und TFIIF von Bedeutung. TFIIF formt einen stabilen Komplex mit Pol II in Lösung und rekrutiert die Polymerase zum Promotor. Der sogenannte Präinitiationskomplex (PIC) wird durch Bindung von TFIIIE und TFIIH vervollständigt. TFIIH ist entscheidend für den Übergang in die Elongationsphase d.h. der eigentlichen Transkriptionsreaktion nach Verlassen des Promotors durch Pol II (*promotor escape*), was durch zwei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten bewirkt wird. Während bakterielle Polymerase die Fähigkeit besitzt den DNA-Doppelstrang selbst zu trennen, benötigt eukaryotische Pol II die

Helikase-Aktivität von TFIIH. Darüber hinaus kann die Kinase Cdk7 innerhalb TFIIH die CTD der Pol II hyperphosphorylieren und damit ihre Lösung von der Promotorplattform einleiten. TFIIIE ist ein Hilfsfaktor für TFIIH und für dessen Rekrutierung und Regulation verantwortlich.



**Abbildung 1-1: Schematisierter Aufbau des Präinitiationskomplexes** (b) aus Generellen Transkriptionsfaktoren an einem eukaryotischen Modellpromotor (a). Die Elemente des Corepromotors TATA-Box, *Initiator* (Inr), *Downstream-Promotorelement* (DPE) werden durch Untereinheiten von TFIID, TBP bzw. TAFs gebunden und die Interaktion durch TFIIA stabilisiert. RNA Polymerase II wird via TFIIB und TFIIF rekrutiert, wobei ersterer Faktor an das BRE-Element des Corepromotors bindet. Zuletzt werden TFIIH und TFIIIE in den PIC eingebunden. Dort öffnet TFIIH den DNA-Doppelstrang und phosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der Pol II. Nach Übergang in die Elongationsphase (c) und Beginn der RNA-Synthese (grün) bleiben ein Komplex aus TFIID und TFIIA am Promotor zurück. Üblicherweise enthalten Promotoren zusätzliche Regulator-Bindungsstellen (X, Y, Z), welche die in diesem Beispiel vorgestellte basale Transkriptionsmaschine beeinflussen.



## 1.5 Elongation und RNA-Prozessierung

Die Transkription in Eukaryoten schreitet mit einer Geschwindigkeit von 1000-2000 Nukleotiden/min voran. Die Reaktion pausiert aber häufig und wird durch Elongationsfaktoren wie Elongin oder TFIIS wieder in Gang gesetzt (Übersicht in Conaway et al. 2000). Andere Elongationsfaktoren wie das Protein CSB bewirken die bevorzugte Reparatur von DNA-Schäden in transkribierten Bereichen (Troelstra et al. 1992).

Eine Reihe von Prozessen, die an die Transkription und z.T. untereinander gekoppelt sind, bewirken eine Modifikation der entstehenden RNA (Proudfoot et al. 2002). Kurz nach Beginn der Elongation wird die sogenannte prä-mRNA bereits von assoziierten Proteinen modifiziert. Zuerst wird das 5'-Ende der RNA in mehreren enzymatischen Schritten mit einer 7-Methylguanosin-Rest (*cap*) versehen. Ein kurzes Signal auf der DNA bewirkt später die Abspaltung der prä-mRNA und das Anheften eines poly-A-Schwanzes. Dieser Prozess sowie der Einfluß weiterer Signale und Faktoren bewirkt schließlich die Termination der Transkriptionsreaktion.

Nichtkodierende Bereiche (Introns) werden während und nach der Elongation aus der kodierenden Sequenz (Exons) durch Spleißen entfernt.

Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielt die C-terminale Domäne der Pol II, von der aus entsprechende Faktoren auf die neu synthetisierte RNA übertragen werden.

## 1.6 Transkriptionelle Regulation

Mit RNA Polymerase II, GTFs und einem Corepromotor wird *in vitro* eine niedrige, basale Transkriptionsrate erreicht. Es ist fraglich, ob dies auch in der Zelle geschieht. Wahrscheinlich war es im Verlauf der Evolution vorteilhaft, den Anteil basaler Transkription gegenüber spezifisch aktivierter Transkription geringzuhalten, um aus einem Genotyp eine Vielzahl höchst unterschiedlicher Phänotypen erzeugen zu können. In allen Lebewesen besteht eine generelle Notwendigkeit für transkriptionelle Regulation, ermöglicht sie doch einer Zelle, auf Änderungen der Umweltbedingungen zu reagieren oder ihre spezifische Funktion in einem multizellulären Organismus zu erfüllen.

Ein eukaryotisches Gen besitzt üblicherweise einen Satz von Bindungsstellen für eine kleine Auswahl aus Tausenden von Transkriptionsfaktoren: Aktivatoren und Repressoren (Übersicht in Kadonaga 2004). Transkriptionsfaktoren binden kurze Sequenzelemente auf der DNA an Promotor- oder Enhancerregionen und nehmen

Einfluß auf den Aufbau des Präinitiationskomplexes. So können sie in Abhängigkeit der Verbreitung der Bindestelle sehr unterschiedlich große Gruppen von Genen regulieren. Die parallele Regulation mehrerer Gene ist insbesondere dann notwendig, wenn für komplexe enzymatische Reaktionen eine Vielzahl von Proteinen benötigt wird. Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren besitzen neben eventuellen regulatorischen Elementen minimal eine DNA-Bindungsstelle und eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne. Zur Vermittlung von Aktivierung und Repression können sie selbst enzymatische Aktivität besitzen. Häufiger jedoch sind die entsprechenden Domänen Bindungsstellen für Cofaktoren, d.h. Coaktivatoren und Corepressoren. Diese Art einer Arbeitsteilung ist für den Organismus sinnvoll, denn so ist ein Transkriptionsfaktor bei geringem eigenen Molekulargewicht in der Lage über einen Multiprotein-Cofaktorkomplex weitreichenden Einfluß auf die Initiation der Transkription zu nehmen.

## 1.7 Transkriptionscofaktoren

Viele sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren benötigen für die Vermittlung der Aktivierung oder Reprimierung von Genen die Aktivität von Cofaktoren. Die ersten dieser Transkriptionscofaktoren wurden im Anschluß an die Klonierung des TATA-bindenden Proteins TBP entdeckt. Es wurde die Beobachtung gemacht, daß TBP im Gegensatz zum nativen TFIID-Komplex in gereinigten Transkriptionssystemen keine aktivierte, sondern nur eine basale Transkription vermitteln konnte (Dynlacht et al. 1991, Pugh und Tjian 1990). Die TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) als Bestandteil von TFIID interagieren sowohl mit Corepromotor-Regionen als auch mit Aktivierungsdomänen in regulatorischen Faktoren, wie später gezeigt werden konnte (Naar et al. 2001).

Weitere Generelle Transkriptionscofaktoren wurden zuerst aus einer Fraktion menschlicher Kernextrakte isoliert: USA (*upstream factor stimulatory activity*) (Meisterernst et al. 1991). Es wurde beobachtet, daß die aktivatorabhängige Transkription in komplexen, z.B. aus Kernextrakt bestehenden, *in-vitro*-Transkriptionssystemen besser stimulieren ließ als in gereinigten Systemen, die im wesentlichen GTFs und Pol II enthielten. Zugabe der USA-Fraktion zum gereinigten System bewirkte eine Anhebung der Aktivierung auf das Niveau des komplexen Systems. Im Folgenden wurden sechs positive Cofaktoren (PC1-PC6) und zwei negative Cofaktoren (NC1 und NC2) aus der USA isoliert. PC1 und PC3 ließen sich den einzelnen enzymatischen Aktivitäten PARP1 und Topoisomerase I zuordnen. PC4

ist ebenfalls ein monomeres Polypeptid und kann phosphorylierungs- und kontextabhängig die Initiation positiv oder negativ modulieren. PC2 gehört zu den Mediator-Komplexen und besteht aus über 20 Polypeptiden.

Es wurden darüber hinaus weitere Proteine und Proteinkomplexe mit Cofaktoreigenschaften beschrieben. Die Gruppe der chromatinmodifizierenden Cofaktoren und die Mediator-Komplexe einschließlich der PC2-Aktivität werden im Folgenden näher dargestellt.

## 1.8 Der Mediator-Komplex

Mediator-Komplexe, zu denen auch PC2 gehört, sind Cofaktoren für nahezu alle Hormonrezeptoren und darüber hinaus Bestandteil vieler Signalwege, z.B. Ras, Jak-STAT, Aktivierung durch *Herpes simplex* VP16. Man kann sich den Mediator vereinfacht als eine Brücke zwischen einem sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor und der transkriptionellen Maschinerie, insbesondere der Pol II, vorstellen.

### 1.8.1 Entdeckung und Isolierung der Mediator-Komplexe

Mediator-Komplexe aus der Hefe wurden bereits Anfang der 1990er Jahre als Coaktivatoraktivität beschrieben (Flanagan et al. 1991) und als Komplex gereinigt (Kim et al. 1994). Im Komplex befanden sich Untereinheiten, die bereits vorher in genetischen Untersuchungen mit der Transkription proteinkodierender Gene in Verbindung gebracht wurden (Beispiele in Suzuki et al. 1988, Nonet und Young 1989).

In Metazoen wurden Mediator-Komplexe als zuerst Cofaktoraktivität PC2 entdeckt und beschrieben (Meisterernst et al. 1991, Kretzschmar et al. 1994b). Im Folgenden wurden unabhängig voneinander die (vermeintlich) unterschiedlichen Komplexe TRAP, ARC/CRSP, DRIP, SMCC über ihre Bindung an Hormonrezeptoren und Aktivatoren aufgereinigt (Fondell et al. 1996, Naar et al. 1998, Ito et al. 1999, Malik und Roeder 2000, Sato et al. 2004). Erst Ende der 1990er Jahre konnte die Aktivität PC2 den humanen Mediator-Komplexen zugeordnet werden und so wurde auch die Verwandtschaft zum Hefe-Mediator offenbart (Malik et al. 2000a).

### 1.8.2 Komposition und evolutionäre Konservierung der Mediator-Komplexe

Etwa 30 Polypeptide wurden als Untereinheiten des menschlichen Mediator-Komplexes identifiziert und nach umfangreichen Analysen ist anzunehmen, daß die Komposition des Mediators im wesentlichen bestimmt ist (Sato et al. 2004).

Während 22 dieser Untereinheiten Orthologe in der Hefe besitzen, scheint die Komposition der Komplexe in *Drosophila* und Mensch identisch zu sein. Größere Homologiebereiche sind nur in MED31, dem Cdk8/Cyclin C-Paar und in MED23 zu finden – bei anderen Untereinheiten ist die Primärstruktur im Laufe der Evolution großen Veränderungen unterworfen gewesen. Dies ist in Abbildung 1-2 illustriert.

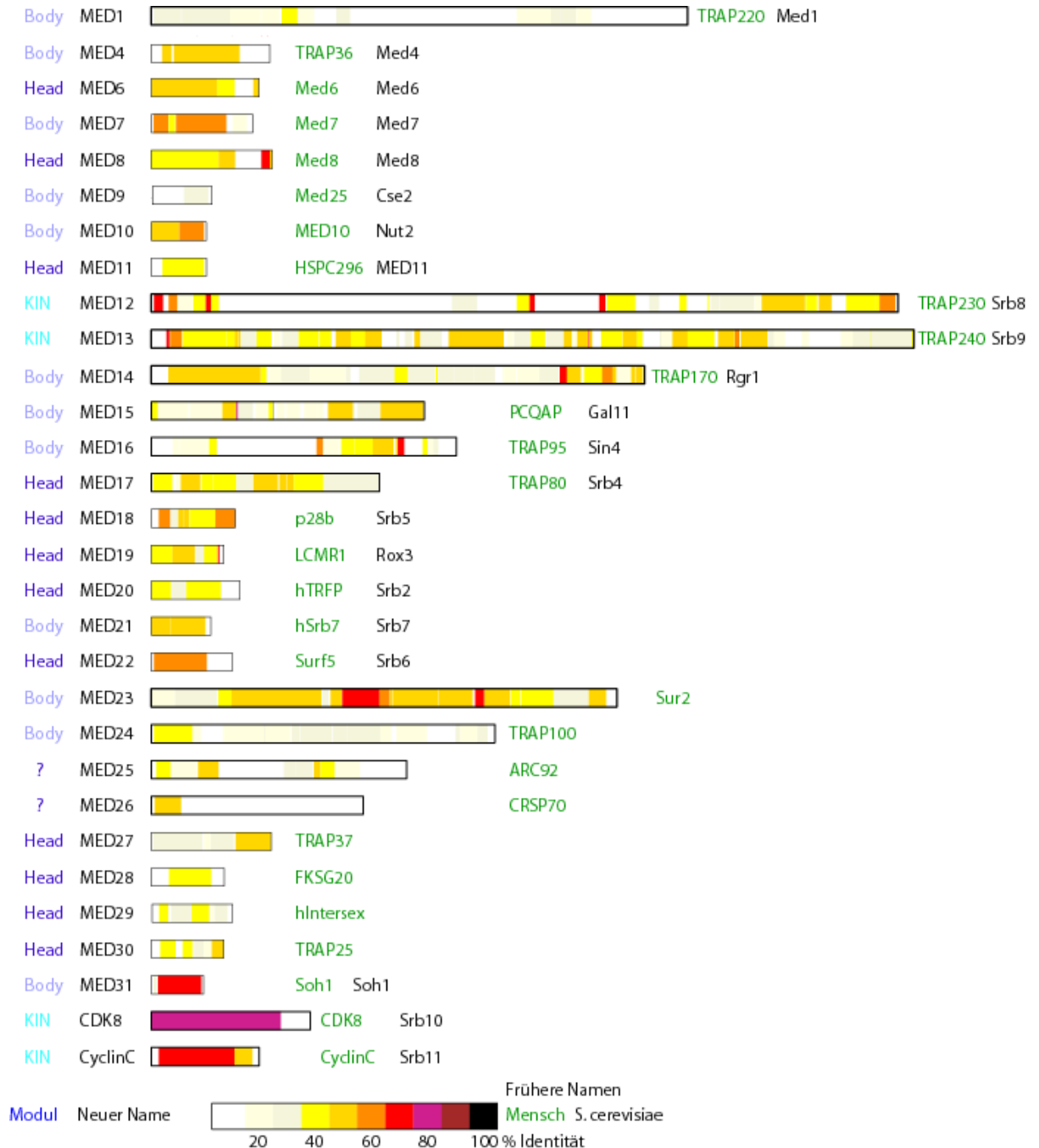
Sieben Untereinheiten sind ausschließlich in Metazoen vorhanden und könnten einen Teil der Komplexität höherer Organismen widerspiegeln. So sind MED23 und MED25 Bindestellen für Aktivatoren, die MED26 Untereinheit markiert eine Subpopulation von Mediator-Komplexen und MED23, MED24 in Verbindung mit dem Sin4-Ortholog MED16 bilden ein Submodul, das offenbar Konformationsänderungen im Komplex bewirken kann (Mittler et al. 2003, Stevens et al. 2002, Ryu et al. 1999, Ito et al. 2002).

Die bekannten Paraloge von MED12, MED13 und Cdk8, sowie Spleißvarianten und etwaige substöchiometrische Untereinheiten erlauben theoretisch eine große kombinatorische Vielfalt von Mediator-Komplexen, doch ist wenig über spezifische Funktionen bekannt. In allen untersuchten Organismen von der Hefe bis zum Menschen lassen sich jedoch zwei verschiedene Arten von Komplexen identifizieren, die sich in ihrer Funktion unterscheiden (Samuelsen et al. 2003).

Nur ein Teil der Mediator-Komplexe (beschrieben als TRAP/SMCC, ARC/DRIP, NAT) besitzt das relativ große Kinase-Submodul bestehend aus Cdk8, Cyclin C, MED12, MED13 bzw. den entsprechenden Paralogen (Fondell et al. 1996, Naar et al. 1999, Sun et al. 1998a, Samuelsen et al. 2003). Der kleinere Mediator-Komplex (beschrieben als PC2, CRSP und B-MED) enthält statt des Kinase-Moduls die Untereinheit MED26 (Malik et al. 2000a, Ryu et al. 1999, Mittler et al. 2001).

In Abwesenheit einer hochauflösenden Röntgenstruktur wurde die Struktur des Mediators anhand von elektronenmikroskopischen Bildern und biochemischen Interaktionsstudien weiter charakterisiert (Asturias et al. 1999, Dotson et al. 2000, Sato et al. 2003b, Guglielmi et al. 2004). Hierbei sind deutliche Ähnlichkeiten zwischen den Komplexen in Mensch und Hefe zu erkennen. Der Mediator hat eine langgestreckte Form die sich in drei Module gliedert: *Head*, *Middle (Body)*, *Tail (Leg)*. Die *Head*-Region stellt die entscheidenden Kontakte zur Pol II her (Ranish et al. 1999) und ist für

das Wachstum von Hefe essentiell. Die *Tail*-Region ist am wenigsten konserviert und enthält jeweils für Hefe und höhere Metazoen spezifische Untereinheiten.

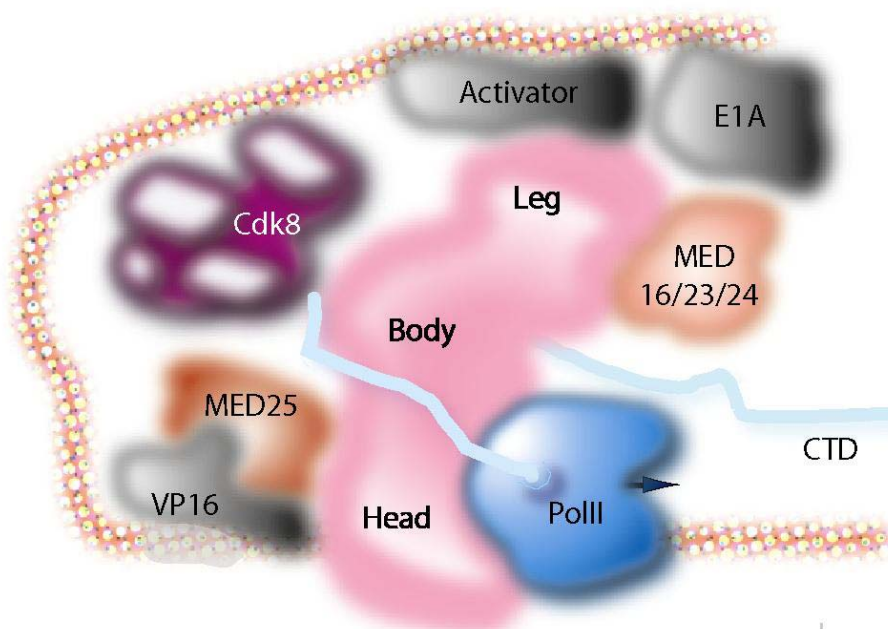


**Abbildung 1-2: Evolutionäre Konservierung der Mediator-Komplexe in Metazoen.** Bereiche innerhalb humaner Mediator-Untereinheiten sind in Abhängigkeit von ihrer Konservierung zu den entsprechenden Proteinen in *D. melanogaster* koloriert. Es sind die Namen der Untereinheiten nach der neuen Nomenklatur (Bourbon et al. 2004) und zusätzlich die häufig verwendeten Namen in *H. sapiens* und *S. cerevisiae* angegeben. Ebenfalls ist die wahrscheinliche Lokalisation innerhalb des Komplexes genannt (Modul).

### 1.8.3 Die Rolle des Mediators in Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation

Der Mediator hat eine bedeutende Funktion in der Transkription vieler Gene. In der Hefe ist die Transkription nahezu aller Gene von der Untereinheit MED17/Srb4 abhängig (Holstege et al. 1998). *Knock-out*-Experimente in *M. musculus* demonstrierten die Bedeutung der Untereinheiten MED1/TRAP220 und Med24/TRAP100 in der transkriptionellen Aktivierung durch vielfältige Faktoren (Ito et al. 2000, Ge et al. 2002, Ito et al. 2002). Eine sehr gut untersuchte Beispiel der Mediator-vermittelten Aktivierung ist das VP16-Protein aus *Herpes simplex*, das im Menschen und in der Hefe (heterolog) als Aktivator wirken kann (Abbildung 1-3).

VP16 bindet die MED17/TRAP80/Srb4-Untereinheit und zusätzlich die metazoenspezifische MED25/ACID1-Untereinheit (Ito et al. 1999, Mittler et al. 2003). Die Aktivierung konnte durch die Überexpression von MED25-Mutanten deutlich verringert werden, was zeigt, daß VP16 trotz vielfältiger Interaktionen mit anderen Cofaktoren seine Funktion im Wesentlichen durch den Mediator bzw. MED25 ausübt. Die zahlreichen bekannten Interaktionen zwischen transkriptionellen Regulatoren und einzelnen Mediator-Untereinheiten sind in Tabelle 1-1 zusammengefaßt.



**Abbildung 1-3: Mediator-Bindung an Promotor-Regionen.** Über seine modulare Struktur kann der Mediator-Komplex vielfältige Interaktionen mit regulatorischen Faktoren (in diesem Beispiel durch E1A und VP16 repräsentiert) sowie mit Pol II eingehen. Ein Teil der Mediator-Komplexe enthält zusätzlich das Kinase-Modul (Cdk8).

Faktor	Untereinheit	Literaturstellen
ER $\alpha$ and $\beta$	TRAP220/MED1	Zhu et al. 1999, Burakov et al. 2000, Warmmark et al. 2001, Kang et al. 2002
AR	TRAP220/MED1	Wang et al. 2002
GR	TRAP220/MED1, TRAP170/MED14	Hittelman et al. 1999
TR $\alpha$	TRAP220/MED1, hSrb7/MED21	Yuan et al. 1998, Zhu et al. 1997, Nevado et al. 2004
TR $\beta$	TRAP220/MED1	Yuan et al. 1998, Zhu et al. 1997
VDR	TRAP220/MED1	Rachez et al. 1999
RAR $\alpha$	TRAP220/MED1	Zhu et al. 1997, Shao et al. 2000
RXR $\alpha$	TRAP220/MED1	Zhu et al. 1997, Yuan et al. 1998
PPAR $\alpha$	TRAP220/MED1	Zhu et al. 1997, Yuan et al. 1998
PPAR $\gamma$	TRAP220/MED1	Zhu et al. 1997, Ge et al. 2002
HNF-4	TRAP220/MED1 TRAP170/MED14	Malik et al. 2002
FXR	TRAP220/MED1	Pineda Torra et al. 2004
ROR $\alpha$	TRAP220/MED1	Atkins et al. 1999
STAT2	TRAP170/MED14, TRAP80/MED17	Lau et al. 2003
Elk-1	SUR2/MED23	Stevens et al. 2002
Esx/Elf-3	SUR2/MED23	Asada et al. 2002, Shimogawa et al. 2004
C/EBP $\beta$	SUR2/MED23	Mo et al. 2004
SMAD2, SMAD3, SMAD4	PCQAP/ARC105/MED15	Kato et al. 2002
DSX <sup>F</sup>	Intersex/MED29	Sato et al. 2003a, Garrett-Engele et al. 2002
SOX9	TRAP230/MED12	Zhou et al. 2002
Dif (dmNF- $\kappa$ B like)	DmTRAP80/MED17, TRAP95/MED16, SUR2/MED23, ACID1/ARC92/MED25	Park et al. 2003, Kim et al. 2004
E1A-13S	SUR2/MED23	Stevens et al. 2002, Wang und Berk 2002
RTA	TRAP230/MED12	Gwack et al. 2003
VP16	ACID1/ARC92/MED25, TRAP80/MED17	Mittler et al. 2003, Ito et al. 1999, Yang et al. 2004
Myc	Cdk8	Eberhardy und Farnham 2002
p53	TRAP220/MED1, TRAP80/MED17	Drane et al. 1997, Frade et al. 2000, Ito et al. 1999
BRCA1	TRAP220/MED1	Wada et al. 2004
HSF	DmTRAP80/MED17, SUR2/MED23, ACID1/ARC92/MED25	Park et al. 2001, Kim et al. 2004
Aryl HC Rezeptor	TRAP220/MED1	Wang et al. 2004
SREBP-1a	TRAP170/MED14	Toth et al. 2004

**Tabelle 1-1: In der Literatur beschriebene Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Mediator-Untereinheiten.**

#### 1.8.4 Mechanismen des Mediators in der Transkription

Vielfältige Interaktionen zwischen dem Mediator und Aktivatoren wurden bisher beschrieben. Um seine Funktion als Coaktivator erfüllen zu können, wird der Mediator-Komplex zusätzlich mit den Komponenten des Präinitiationskomplexes interagieren. Eine der bedeutendsten Funktionen des Mediators ist sehr wahrscheinlich die Rekrutierung und Stabilisierung der Pol II an Promotor-Regionen. So bindet Mediator Pol II in Lösung (Kim et al. 1994, Myers und Kornberg 2000, Taatjes et al. 2004), welches eine zeitgleiche Bindung an Promotoren vermuten läßt (Thompson et al. 1993). Dies konnte an einigen Promotoren beobachtet werden (Hatzis und Talianidis 2002, Metivier et al. 2003), während in anderen Studien Mediator zeitlich vor der Polymerase rekrutiert wurde (Cosma et al. 2001, Park et al. 2001).

Ebenfalls gibt es vereinzelte Hinweise auf Interaktionen mit den GTFs TFIID und TFIIF (Yudkovsky et al. 2000, Johnson et al. 2002), die eine Stabilisierung des PIC bewirken könnten.

#### 1.8.5 Funktionen der „kleinen“ Mediator-Komplex in basaler und aktivierter Transkription

In Übereinstimmung mit der Bindung an die RNA Polymerase II und evtl. GTFs stimuliert Mediator in Abwesenheit eines Aktivators auch die basale Transkription (Kim et al. 1994). In groben *in-vitro*-Transkriptionssystemen, die den Bedingungen in der Zelle nachempfunden sind, wurde sogar die Notwendigkeit eines bestimmten Mediators – B-MED - für die basale Transkription nachgewiesen (Mittler et al. 2001). Dieser Komplex gehört zu den „kleinen“ Mediator-Komplexen ohne Kinase-Modul. Bedeutende Coaktivator-Funktionen für VP16, HNF4 und Sp1 wurden ebenfalls mit Mediator-Komplexen (CRSP, PC2) in Verbindung gebracht, die frei von Cdk8 sind (Kretschmar et al. 1994a, Naar et al. 1998).

Als charakteristische Eigenschaft zumindest eines dieser Komplexe (CRSP) wurde die Bindung der Pol-II-CTD beschrieben (Naar et al. 2002). Die Entfernung der CTD *in vitro* inaktiviert nicht die enzymatische Funktion der Pol II, aber sie verhindert die positiven Effekte des Mediators in basaler und aktivierter Transkription (Myers et al. 1998). Grundsätzlich ist nicht auszuschließen, daß die durch Mediator aktivierte Transkription nur eine Steigerung der basalen Transkription darstellt. Die Funktion des Aktivators wäre dann die Rekrutierung des Mediator-Komplexes, der daraufhin mit höherer Effizienz dieselben Interaktionen am PIC eingehen kann wie bei der Initiation



auf basalem Niveau. Allerdings wurden Konformationsänderungen des Mediators in Abhängigkeit vom gebundenen Aktivator beschrieben (Taates et al. 2002). Zudem binden manche Aktivatoren wie VP16 neben dem Mediator-Komplex weitere Coaktivatoren.

### 1.8.6 Kinase-Modul und Regulation von TFIID

Viele Informationen über die Coaktivator-Aktivität menschlicher Mediator-Komplexe wurden mit gemischten Präparationen gewonnen, wie man sie beispielweise mittels Aufreinigung über einen Hormonrezeptor erhält. So konnte in diesen Fällen die Rolle des Kinase-Moduls nicht gezielt betrachtet werden.

Cdk8 besitzt die einzige bekannte enzymatische Aktivität im Komplex und kann durch Phosphorylierung von Cyclin H die Kinase-Aktivität der Cdk7 als Komponente von TFIID reprimieren (Akoulitchew et al. 2000). Dagegen aktiviert der Mediator aus Hefe die Kinase-Aktivität in TFIID (Guidi et al. 2004).

Beide Kinasen, Cdk7 und Cdk8, können die CTD der Pol II an Serin-5-Resten phosphorylieren. Allerdings kann ausschließlich Cdk7 eine Vielzahl von Resten sequentiell modifizieren, ein entscheidender Schritt im Übergang von der Initiation zur Elongation. Zudem kann die Phosphorylierung durch Cdk8 vor dem Aufbau des PIC erfolgen und ihn stören (Hengartner et al. 1998). So wurden die großen Mediator-Komplexe des Menschen nach Untersuchungen mit *in-vitro*-Transkriptionssystemen als inaktiv oder repressiv beschrieben (Sun et al. 1998a, Naar et al. 2002).

Bis zum heutigen Tag ist unbekannt, in welcher Situation *in vivo* welcher Komplex spezifisch rekrutiert wird. Bisher ist nur vom Transkriptionsfaktor SOX9 berichtet, daß dieser Mediator direkt über das Kinase-Modul bindet (Zhou et al. 2002), während alle anderen Transkriptionsfaktoren offenbar Untereinheiten binden, die Bestandteil aller Mediator-Komplexe sind.

## 1.9 Transkription im Chromatin

*In-vitro*-Transkriptionsexperimente, die zur Aufklärung der Funktionen von Pol II, GTFs und Cofaktoren betrogen, wurden meist mit unverpackten, künstlichen Genen d.h. freier DNA durchgeführt.

Die Bedingungen in der Zelle unterscheiden sich erheblich davon: die DNA eines menschlichen Chromosoms würde ausgestreckt eine Länge von mehreren Zentimetern erreichen und muss daher insbesondere während der Zellteilung, aber auch in der Interphase um einen vierstelligen Faktor kondensiert sein. Hierzu sind etwa 146 Basenpaare um einen zylinderförmigen Komplex aus Histonproteinen gewickelt, den man zusammen mit der DNA als Nukleosom bezeichnet (Struktur von Luger et al. 1997). Zwischen den Nukleosomen befinden sich ca. 10-60 Basenpaare DNA. Der Nukleosomen-Kern (Oktamer) besteht aus einem Histon H3/H4-Tetramer und zwei H2A/H2B-Dimeren. Ein Linker-Histon H1 bindet die austretenden DNA-Stücke und trägt im Zusammenhang mit anderen Mechanismen zur weiteren Kondensation in eine 30-nm-Faser bei, in der sich die Nukleosomen in einem Zickzackmuster gegenüberstehen. Diese dienen wiederum als Grundlage für übergeordnete Strukturen des Chromatins. Abweichungen in dieser Struktur werden durch andere DNA-bindende Polypeptide wie die HMG-Proteine bewirkt.

Alle DNA-gebundenen Prozesse wie die DNA-Replikation und die Transkription müssen *in vivo* in einer Chromatinumgebung stattfinden. Hierzu bedient sich die Zelle beispielsweise einer Reihe von Chromatin-Umformungskomplexen (*chromatin remodeling*), die unter Spaltung von ATP die Chromatin-Struktur lokal auflockern können. Auch werden die Histone positionsabhängig in vielfacher Weise posttranslational modifiziert.

Diese und vergleichbare Prozesse tragen dazu bei, daß sich über solche lokalen Einflüsse hinaus transkriptionell aktive (Euchromatin) und inaktive (Heterochromatin) Domänen innerhalb der Chromosomen ausbilden. Die Aktivität des Gens ist unter daher nicht allein von der transkriptionellen Maschine und spezifischen regulatorischen Faktoren abhängig, sondern auch von der Position auf seinem Chromosom.

### 1.9.1 Posttranslationale Modifikationen der Histone

Histone in Nukleosomen können auf vielfältige Weise enzymatisch modifiziert werden. Hauptsächlich sind es die flexiblen, aus dem Nukleosomen-Kern

herausragenden N-termini der Histone, welche die kovalenten Modifikationen tragen. Histone können durch Acetylierung (und Deacetylierung), Methylierung und Phosphorylierung, aber auch durch Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung modifiziert werden (Weiterführende Informationen in Peterson und Laniel 2004).

Manche Modifikationen dienen als Bindeplattform für weitere Faktoren. Außerdem ist diskutiert worden, daß Modifikationen die Interaktionen zwischen Nukleosom und DNA sowie zwischen benachbarten Nukleosomen beeinflussen könnten (Luger und Richmond 1998). Histonmodifizierende Enzyme sind bemerkenswert substratspezifisch. Häufig wird nur eine einzelne Position eines Histons modifiziert. Weitere Erkenntnisse, daß beispielsweise Methylierungen in Abhängigkeit von ihrer Position ganz unterschiedliche Auswirkungen auf die Transkription haben können, führten schließlich zur Postulierung eines Histoncodes (Strahl und Allis 2000, Jenuwein und Allis 2001). Verschiedene Chromatinzustände sind demnach durch bestimmte Modifikationen und Kombinationen hiervon gekennzeichnet.

### 1.9.2 Chromatin-Umformungskomplexe

Die Verpackung der DNA in Nukleosomen bewirkt eine generelle Repression der Transkription *in vitro* und *in vivo* (Imbalzano et al. 1994, Grunstein 1997). Daher findet man in Eukaryoten neben histonmodifizierenden Aktivitäten auch mehrere Proteinkomplexe, die unter ATP-Verbrauch die Topologie des Chromatins beeinflussen können (Übersicht in Lusser und Kadonaga 2003). Die Aktivität dieser Komplexe basiert jeweils auf einer ATPase-Untereinheit, welche bereits in isolierter Form enzymatische Funktion besitzt und durch weitere Untereinheiten moduliert und ergänzt wird. Anhand der ATPase unterscheidet man Komplexe der SNF2- (SWI/SNF), ISWI- und CHD1-Subfamilien der SNF2 Proteinfamilie (Eisen et al. 1995). Daneben gibt es weniger gut untersuchte Komplexe, die auf den Ino80, Rad54 und CSB-Proteinen basieren. Trotz einer Verwandtschaft der ATPase-Untereinheiten unterscheiden sich die Komplexe in ihren Wirkungen auf das Chromatin und in ihrer generellen Funktion. Ganz im Gegensatz zu den SWI/SNF-Komplexen stabilisieren die ISWI-Komplexe das Chromatin und begünstigen die Bildung von Nukleosomen (Beispiel in Ito et al. 1997). Die Mi-2/NuRD-Komplexe aus der CHD1-Familie besitzen zusätzlich eine HDAC-Aktivität und werden durch H3-Lysin-4-Methylierung als Marker des Euchromatins verdrängt (Xue et al. 1998, Nishioka et al. 2002).

SWI/SNF-Komplexe zeigen die ausgeprägtesten Cofaktoreigenschaften in der Transkription, denn sie können durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren

rekrutiert werden. Mit geeigneten Experimenten lassen sich *in vitro* mehrere Funktionen dieser Komplexe trennen: durch unterbrechen von Histon-DNA Wechselwirkungen können sie Nukleosomen entfernen, zwischen verschiedenen DNA-Doppelsträngen transferieren oder sie durch Mobilisierung entlang der DNA verschieben (*nucleosome sliding*). Bemerkenswerterweise umfasst die Verschiebung mit 50-80 Nukleotiden in etwa die Länge einer Windung um den Nukleosomen-Kern (Kassabov et al. 2003).

In menschlichen Zellen gibt es mindestens drei SWI/SNF-Komplexe. Dazu gehören zwei sehr ähnliche Komplexe aus mindestens zehn Untereinheiten, die auf den paralogen ATPasen hBRM und BRG1 basieren und als SWI/SNF oder BAF bezeichnet werden (Wang et al. 1996). Hinzu kommt ein Komplex SWI/SNF-B bzw. PBAF, der BRG1 enthält und der statt der BAF250-Untereinheit das BAF180-/Polybromo-Protein enthält (Nie et al. 2000, Xue et al. 2000). Trotz ihrer Ähnlichkeit sind die Komplexe in der Aktivierung bestimmter Gene nicht gegeneinander austauschbar (Übersicht in Wang 2003).

BRM, BRG1 und BAF180 enthalten Bromodomänen, die acetylierte Histone binden können (Marmorstein und Berger 2001, Hassan et al. 2001) - eine Eigenschaft, die die Rekrutierung der Komplexe und ihren Verbleib am Promotor reguliert. Zudem haben die Histon-N-termini einen Einfluß auf die Funktion der Komplexe (Logie et al. 1999). *Chromatin remodeling* ist daher kein isolierter Prozeß, sondern unterliegt der Regulation durch Interaktion mit sequenzspezifischen Aktivatoren, weiteren Cofaktoren, DNA und modifizierten Histonen.

### 1.10 Nukleo-cytoplasmatischer Transport von Proteinen

Eukaryotische Zellen sind durch die Aufteilung in subzelluläre Kompartimente gekennzeichnet, die eine räumliche Begrenzung funktionaler Netzwerke erlaubt. Neben der physischen Trennung von biologischen Makromolekülen sind Mechanismen für ihren gerichteten Transport erforderlich. Beispielsweise müssen die gesamte Transkriptionsmaschine und ihre assoziierten Faktoren in den Zellkern transportiert werden.

Nur sehr kleine Proteine < 40-60 kDa können durch Diffusion in den Nukleus gelangen, während größere Proteine Importrezeptoren für ihre Passage durch den Kernporenkomplex (NPC) benötigen. Der NPC ist eine komplexe Struktur aus 50-100 Proteinen mit einem Gesamtmolekulargewicht über 120 MDa. Phenylalaninreiche Sequenzen in den sogenannten Nukleoporinen schaffen dabei durch wechselseitige Interaktionen eine hydrophobe Umgebung, die bis auf die ebenfalls sehr hydrophoben Importrezeptoren und ihre Komplexe mit Kernproteinen andere Proteine ausschließt (Ribbeck und Gorlich 2002). Die subzelluläre Lokalisation von Kernproteinen wird durch kurze Sequenzabschnitte reguliert i.e. Kernimport- (NLS) und Kernexportsequenzen (NES), die von sogenannten Importinen und Exportinen gebunden werden. Die meisten Kernproteine besitzen eine sogenannte „klassische“ NLS. Dies ist eine kurze ein- oder zweiteilige Sequenz, die mehrere Reste der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin enthält und die von Importin  $\alpha$  im Importin- $\alpha$ /Importin  $\beta$ -Heterodimer gebunden wird (Kalderon et al. 1984, Robbins et al. 1991, Enenkel et al. 1995, Gorlich et al. 1995, Moroianu et al. 1995). Die strukturellen Grundlagen der NLS-Erkennung konnten detailliert aufgeklärt werden (Conti et al. 1998, Fontes et al. 2000). Insgesamt gibt es sechs Isoformen von Importin  $\alpha$ , die jeweils eine leicht unterschiedliche Spezifität aufweisen.

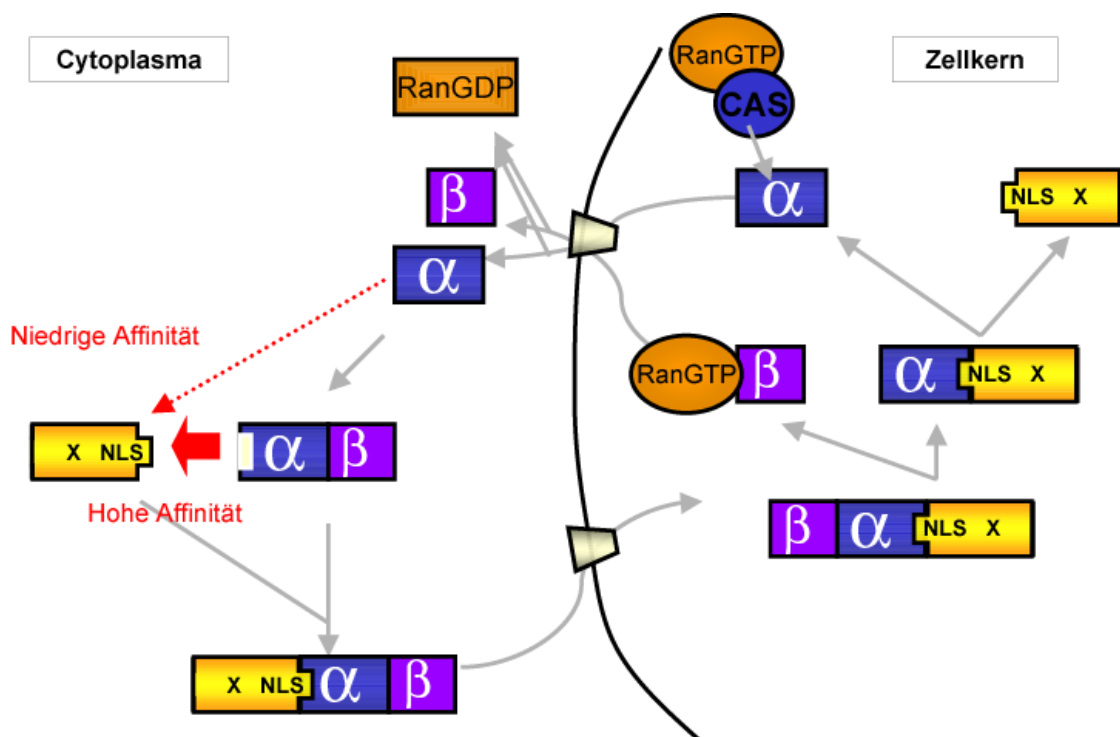
Importin  $\beta$  vermittelt den Transport durch die Kernpore, während Importin  $\alpha$  im wesentlichen ein vielfältiges Adaptermolekül darstellt, das mehrere hundert verschiedene NLS-Sequenzen binden kann. Zudem wird Importin  $\beta$  für eine effiziente Bindung an das Kernprotein benötigt, weil seine Bindungsstelle (IBB) im Importin- $\alpha$ -Molekül mit einer autoinhibitorischen Domäne überlappt. Diese intramolekulare NLS-ähnliche Sequenz blockiert in Abwesenheit von Importin  $\beta$  die NLS-bindende Region von Importin  $\alpha$ .

Der dimere Aufbau des Importrezeptors dient der Dissoziation des Kernproteins im Zellkern und ermöglicht somit eine Rückführung der Importine. Nach Translokation

des Trimers aus den Importinen und dem Kernprotein in den Zellkern bindet ein kleines GTP-gebundenes Protein – RanGTP – an Importin  $\beta$  und verdrängt es aus dem Komplex (Abbildung 1-4). Das Kernprotein wird anschließend durch den Effekt der autoinhibitorischen Domäne von Importin  $\alpha$  gelöst.

Freies Importin  $\alpha$  wird über einen Adapter (CAS) schließlich ebenfalls von RanGTP gebunden und verlässt wie auch Importin  $\beta$  den Zellkern. Durch GTP-Hydrolyse von Ran im Cytoplasma werden beide Importine wieder freigesetzt. Der erhebliche Gradient von nukleärem RanGTP zu cytoplasmatischem RanGDP bewirkt dabei Antrieb und Richtung des Kernimports (Izaurralde et al. 1997).

Der Zellkernexport über leucinreiche Kernexportsignale (NES) und das Exportin CRM1 verläuft ähnlich: im Zellkern wird die NES eines Kernproteins von CRM1 und RanGTP gebunden und nach Translokation durch anschließende GTP-Hydrolyse im Cytoplasma wieder freigesetzt.



**Abbildung 1-4: Zellkernimport von Proteinen mit klassischer Kernlokalisationssequenz.**

Heterodimerisierung von Importin  $\alpha$  mit Importin  $\beta$  legt eine NLS-Bindestelle frei, die mit hohen Affinitäten Kernproteine binden kann. Der trimere Komplex tritt über den Kernporenkomplex in den Zellkern ein. Die Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$  destabilisiert den Komplex und bewirkt die Freisetzung des Kernproteins sowie die Rückführung der Importine.

### 1.10.1 Regulation von Zellkernimport und -export

Regulierter Kernimport und -export sind wesentliche Elemente in vielen Signalwegen (Übersicht in Cyert 2001), weil sie eine Koordination von signalabhängigen Prozessen zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern ermöglichen. Ein Signalprotein mit Kernlokalisationssequenz, beispielsweise ein Transkriptionsfaktor ist dazu in Anwesenheit eines sehr effizienten Kernimportsystems zeitweilig im Cytoplasma lokalisiert, um sein spezifisches Signal aufzunehmen und es dann in den Kern zu übertragen.

Der Kernimport kann über vielfältige Mechanismen wie Phosphorylierung, Protein-Protein-Interaktionen und Proteolyse beeinflusst werden (Übersicht in Jans et al. 2000). Häufig wird der Kernimport durch die Phosphorylierung an NLS angrenzender Aminosäurereste reguliert. Diese Modifikationen können sowohl positive als auch negative Effekte auf die Affinität zu Importin  $\alpha$  und damit die Effizienz des Kernimportes haben. So wird der Import des Hefe-Transkriptionsfaktors SWI5 durch spezifische Phosphorylierung inhibiert während der Import des Transkriptionsfaktors v-Jun durch Phosphorylierung induziert wird (Moll et al. 1991, Tagawa et al. 1995).

NLS und NES können außerdem intramolekular durch Konformationsänderungen oder intermolekular durch inhibitorische Proteine maskiert werden. Die NLS der p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird beispielsweise durch Assoziation mit I $\kappa$ B maskiert und erst nach proteolytischer Degradation von I $\kappa$ B kann der NF- $\kappa$ B-Heterodimer in den Kern importiert werden. Die meisten der I $\kappa$ B Isoformen besitzen zudem eine Exportsequenz und können den Export von NF- $\kappa$ B aus dem Kern vermitteln, welches zumindest im Falle von I $\kappa$ B $\alpha$  der dominante Mechanismus ist (Johnson et al. 1999). Diese beiden Regulationsmechanismen, Kompensation von NLS durch NES und NLS-Maskierung treten in anderen Proteinen und Proteinkomplexen häufig unabhängig voneinander auf.

Ebenfalls können Zellkernproteine entgegen ihrer Signalsequenz in einem zellulären Kompartiment verankert sein, so z.B. der Transkriptionsfaktor SREBP-2, der über zwei Transmembranregionen an das Endoplasmatische Retikulum gebunden ist und erst nach signalabhängiger Proteolyse in den Zellkern importiert wird. (Nagoshi et al. 1999).

### 1.11 Ausgangssituation und Fragestellung

Proteine besitzen die größte strukturelle und funktionelle Vielfalt biologischer Moleküle. Sie bestimmen die Struktur einer Zelle und sind an nahezu allen biochemischen Reaktionen beteiligt. Für das Verständnis biologischer Vorgänge ist daher die Kenntnis über Struktur, Funktion, Lokalisation und Menge der Proteine von großer Bedeutung. Die Gesamtheit der Proteine einer Zelle wird häufig als Proteom und die entsprechende Wissenschaft als Proteomics bezeichnet. Beide Begriffe haben sich erst in jüngerer Zeit verbreitet, was schon darauf hindeutet, dass die gleichzeitige Betrachtung vieler Proteine lange Zeit mit experimentellen Hindernissen behaftet war und immer noch ist.

Die Abundanz von Proteinen kann um einige Größenordnungen variieren, so daß kein bekanntes Messverfahren auch nur annähernd das gesamte Proteom abbilden kann. Das Auge des Betrachters wird sich vornehmlich auf die leicht detektierbaren und identifizierbaren Proteine richten.

Die Bedeutung eines Proteins für ein biologisches System kann dagegen keineswegs unmittelbar von seiner Abundanz abgeleitet werden. Insbesondere regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren sind häufig nur in geringer Menge vorhanden, während Haushalts- und Strukturproteine oft konstitutiv und in großer Menge exprimiert werden. Im Gegensatz zu den Nukleinsäuren gibt es kein Amplifikationsverfahren für niedrig-abundante Proteine. Vielmehr wird deren Signal durch hoch-abundante Proteine überlagert. Außerdem können unspezifische Verluste bei der Handhabung auftreten, die eine genaue Quantifizierung weiter erschweren. Es besteht daher ein genereller Bedarf an neuen Methoden, die es ermöglichen, Proteine weitestgehend unabhängig von ihrer Kopienzahl in der Zelle zu untersuchen und ihnen eine biologische Funktion zuzuordnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, funktionale Filter zur Detektion und Aufreinigung biologisch interessanter Proteinsubpopulationen (Subproteome) zu entwickeln. Die Optimierung bestehender Protokolle zur Zellfraktionierung sollte mit neuartigen Methoden wie der Generierung motivspezifischen Antikörper verknüpft werden, um signalabhängige Prozesse in Zellen erfassen zu können. Insbesondere waren dabei das Chromatin und Komponenten der transkriptionellen Maschinerie von Interesse, weil beide im Zusammenspiel die Synthese von Proteinen entscheidend mitbestimmen. Sowohl die bestehenden als auch die neuen Methoden sollten auf eine Untersuchung des humanen Mediator-Komplexes, seiner Submodule und Interaktoren angewandt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Hilfsmittel

2D-Gelelektrophoresesystem	IPGphor / Ettan Dalt, Amersham
ÄKTA Chromatographiesystem	Amersham
Acrylamidgelelektrophorese	Amersham / Hoefer SE280, SE600, SE660
Agarosegelelektrophorese	BioRad
Autoradiographiekassetten	Amersham, Kodak
ELISA-Reader	Lambda F, MWG-Biotech
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham
Elektroblot-Apparatur ( <i>semi-dry</i> )	BioRad
Geltrockner	GD2000, Hoefer
Homogenisator	Douncer, Wheaton
Infrarot-Scanner	Odyssey, Licor
Instant Imager	Packard
Konduktrometer	Typ 703, Knick
Konfokales Mikroskop	TCS SP2, Leica
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss
MALDI-Massenspektrometer	Reflex III, Bruker Daltonics
MALDI-Target	Anchorchip 600, Bruker Daltonics
MALDI-TOF/TOF-MS	Proteomics Analyzer 4700, Applied Biosystems
Naßblotapparatur	BioRad
Netzgeräte	EPS 3500, EPS 2A200, Amersham PowerPAC 200, 3000, Biorad
PCR-Thermocycler	GeneAmp 2400, Applied
pH-Meter	Calimatic 760, Knick
Pipetten	Gilson Pipetman P2- P1000
Photometer	GeneQuant Pro, Amersham
Pumpe	P1, Amersham
Rotoren	JA10, JA25-50, SW41, SW28, Beckman
SMART Chromatographiesystem	Amersham
Spinnergefäße	Witeg, Wheaton
Ultraschallgerät	Modell 250-D, Branson
Ultrazentrifugen	L7, L8-M von Beckman

UV-Illuminatoren	Bachofer (254 nm, 366 nm)
Vakuumkonzentrator	RVC2-18, Christ
Zentrifugen	Avanti, Beckman
	Multifuge 3 L-R, Heraeus
	Zentrifuge 5417, 5415R, Eppendorf

## 2.2 Molekularbiologische Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

Chromatographie-Leersäulen	Biorad
CNBr-Sepharose 4B	Sigma
Dialyseschläuche (MWCO 12-14 kDa)	Roth
ECL Western Blot Kit	NEN
Filme X-OMAT, BioMax	Kodak
Gel Drying Kit	Promega
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham
GFX Gel Band Purification Kit	Amersham
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham
IEF-Gelstreifen (IPG)	Amersham
Nitrocellulosemembran	BioRad
Nucleobond AX Plasmid DNA Kit	Macherey & Nagel
pH-Indikatorpapier (Neutralit pH 5-10)	Merck
Phosphocellulose P11	Whatman
Poly-L-Lysin Objekträger	Sigma
Protein G Sepharose FF	Amersham
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore
Silikonisierte Plastikreaktionsgefäße	Sorenson
Silver Staining Kit	PlusOne, Amersham
Sterilfilter (0.22 µm)	Roth
Ultrafiltrationseinheit (MWCO 10/30 kDa)	Vivaspin 2, Vivascience
Ultrafiltrationseinheit (MWCO 10 kDa)	Millipore
Ultrafree-Filterereinheit (0.45 µm Membran)	Millipore
Whatman 3MM Papier	Whatman

## 2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Roth
Acetonitril	Fluka
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 40 % (v/v)	Roth
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 30 % (v/v)	Roth
Acrylamidlösung 30 % (v/v)	Roth
Agarose	Gibco BRL
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamidlösung 2 % (v/v)	Roth
Borat (Natriumsalz)	Roth
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenzlösung	BioRad
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Peqlab
Bromphenolblau	Sigma
n-Butanol	Merck
BSA acetyliert (20 mg/ml Lösung)	Roche
BSA Fraktion V	Sigma
Calciumchlorid	Merck
CHAPS f. d. Elektrophorese	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
Citronensäure	Merck
Citronensäuremonohydrat	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
A-Cyano-4-hydroxymizsäure	Fluka
Deoxycholat	Sigma

---

2,5-Dihydroxybenzoesäure	Fluka
Dimethylformamid	Merck
Dimethylpimelimidat	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM-Medium	Gibco
Ethanol	Merck
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems
Ficoll	Biochrom
Formamid	Merck
Gelatine 2 % Suspension für Zellkultur (G1393)	Sigma
Glucose	Merck
Glutathion	Sigma
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth, Amersham
HEPES	Biomol
2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure	Fluka
Hydroxyphenylglyoxal	Pierce
Igepal CA630 (früher NP-40)	Sigma
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck, Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
N-Laurylsarcosin	Sigma
Leupeptin	Roche
Lithiumchlorid	Sigma

---

Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Maleinsäureanhydrid	Sigma
Manganchlorid	Merck
Methanol	Roth, Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriummolybdat	Sigma
Natriumorthovanadat	Sigma
Nickelsulfat	Merck
Nitroblautetrazolium (NBT)	Peqlab
Nocodazol	Sigma
Nukleotide	Amersham
OMG (3'-O-Methylguanosin)	Amersham
Penicillin-/Streptomycinlösung 100X	Biochrom
Pepstatin A	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Biomol
Phenol (TE-gesättigte Lösung)	Roth
Phorbolmyristylester (PMA)	Sigma
Phytohemagglutinin (PHA-M)	Roche
Phosphorsäure	Merck
PIPES	Biomol
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma
Poly-L-Prolin	Sigma
Poly-L-Serin	Sigma

Ponceau S	Sigma
Ribonukleaseinhibitor	Stratagene
Roti-Phenol/Chloroformlösung	Roth
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL
Saccharose/Sucrose	Merck
Salzsäure (37 %)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tetranatriumpyrophosphat	Sigma
Thioharnstoff	Merck
Tosyl-phenylalanyl-chloromethyl-Keton (TPCK)	Sigma
Trichloressigsäure	Fluka
Trifluoressigsäure	Fluka
Triton-X100	Sigma
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Sigma
Trypsininhibitor	Sigma
$\alpha$ -( $^{32}\text{P}$ )-UTP	NEN
Wasserstoffperoxid 30 %, Perhydrol	Merck
Xylenxanol	Sigma
Yeast tRNA	Roche

## 2.4 Lösungen und Puffer

### 10 x TBE:

1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8.0 RT)

### BCx-Puffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7.3 RT), 1 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerin, x mM KCl

### 20 x PBS:

160 g NaCl, 4 g KCl, 23 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2 –7.4, ad 1000ml

### 10 x TBS:

100 mM Tris-HCl (pH 7.5 RT), 1.5 M NaCl

### 1 x TBST:

1 x TBS, 0.05 % (v/v) Tween 20

**10 x TGS:**

250 mM Tris, 1.92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

**TE:**

10 mM Tris-HCl (pH 8.0 RT), 1 mM EDTA

**2.5 Enzyme**

Alkalische Phosphatase (CIP)	MBI
Casein-Kinase II	NEB
Chymotrypsin, <i>sequencing grade</i>	Roche
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	MBI, NEB
RNase A	Roche
Taq-DNA-Polymerase	MBI
T4-DNA-Ligase	MBI
T4-Polynukleotidkinase	MBI
Trypsin, <i>sequencing grade</i>	Promega

**2.6 Plasmide**

pET11d	Novagen
pHIV-WT	(Meisterernst et al. 1991)
pMLC2AT	(Sawadogo und Roeder 1985)
pML5xGal	(Ge und Roeder 1994)
pGEX-B	M. Meisterernst

## 2.7 Peptide

### Synthetisch:

MED15 6C9-Peptid	VSQAQALPGQMLYTQPPLKF
MED15 1H7-Peptid	SSFLPSPSPQPSQSPVTART
MED25 9C2-Peptid	APQQPLPPVPPQYQVPGNLS
Poly-(Glu/Asp)	DEDEDDEEDDDDEEEDDEEDC
Histon H3 acetyliert	TARKSTGG<K>APR<K>QLAT<K>AAR
MED25 serinreiche Region	PASQPSLVSTVAPGSGGLAPC
PKC Consensus	TTKTARSFKSQRSLRSNKC
Kinase ATP-bindendes Motiv	LGGGQYGEVYLGKGGYGKVC
Helikase ATP-bindendes Motiv	DEMGKGKTGETGSGKTC
MLL SNL-2 (nuclear speckles)	GPRIKHVCRC
MLL SET-Domain	NHSCEPNCYSGEELTYDYC

### Als GST-Fusionsprotein exprimiert:

NLS-Sequenzen	ALKRRKAGPPRKEVPKTPSEPKKKGPKKKRKV
NES-Sequenzen	GIDLSGLTLQ LLERLKEFNL LEKLDLNGN
Kinase ATP-bindendes Motiv	LGEGQFATV IGQGTFGEV IGLGGFGV
Helikase ATP-bindendes Motiv	GATGCGKT AKSGTGKT MATGYGKS

## 2.8 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$  (Hanahan 1985)  
 MC1061 (Casadaban und Cohen 1980)  
 BL21 (DE3) (Studier und Moffatt 1986)  
 BL21 (DE3) Codon Plus RP (Stratagene)

## 2.9 Eukaryotische Zelllinien

Hela-Zellen: humanes Cervix-Karzinom, Suspensionszellen  
 Jurkat-J6: humane Leukämie T-Zell-Lymphoblasten, Suspensionszellen  
 RCC26, RCC53: humane Nierenzellkarzinom-Zelllinie, adhären  
 293T: transformierte primäre humane embryonale Nierenzellen, adhären



## 2.10 Antikörper

### 2.10.1 Primärantikörper

Antigen	Klon/Typ	Herkunft	Hersteller	Western Blot Verdünnung	IP (-/+)
Poly-(D/E)	2G6	Ratte IgM	E. Kremmer	1:100	-
Polyprolin	9A9	Ratte IgM	E. Kremmer	1:50	+
Polyprolin	9E11	Ratte IgG	E. Kremmer	1:50	+
Polyprolin	2C2	Ratte IgG	E. Kremmer	1:50	+
Polyprolin	7G8	Ratte IgG	E. Kremmer	1:50	+
Kinase ATP (LGG)	9C2	Ratte IgG	E. Kremmer	1:50	+
MED15/PAQ	1H7	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	+
MED15/PAQ	6C9	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	+
MED25/ACID1	9C2	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	+
MED7	3E12	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	-
MED6	sc-9433 (E-20)	Ziege	Santa Cruz	1:250	
CRSP70	sc-9426 (T-20)	Ziege	Santa Cruz	1:250	
CRSP70	sc-9425 (C-19)	Ziege	Santa Cruz	1:250	
CRSP77	sc-9428 (S-19)	Ziege	Santa Cruz	1:250	-
TRAP95	sc-5366 (N-16)	Ziege	Santa Cruz	1:250	(-)
TRAP150	sc-5378 (N-18)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	
CRSP130	sc-9431 (L20)	goat	Santa Cruz	1:1000	-
TRAP220	sc-8998 (M-255)	Kaninchen	Santa Cruz	1:250	+
TRAP240	sc-5369 (Y-19)	Ziege	Santa Cruz	1:250	(-)
Cdk8	sc-1521 (C-19)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	+
Cyclin C	sc-1061 (T-19)	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000	
HA	3F10	Ratte IgG	E. Kremmer		
NC2 $\alpha$	4G7	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	+
Pol-II-CTD	8WG16	Maus	(Thompson et al. 1989)	1:30	
GST	6G9	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	
hRPB1	sc-899 (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz	1:30	+
Ini1	sc-9749 (N-20)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	
BAF53A	A22437F	Huhn IgY	Genway	1:1000	
BAF170	sc-9744 (C-19)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	+
Brm	sc-6450 (N19)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	
Brg1	sc-8749 (N-15)	Ziege	Santa Cruz	1:1000	
Brg1	sc-10768 (H88)	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000	+
TRRAP	sc-5405 (T-17)	Ziege	Santa Cruz		+
p300	cs-584 (N-15)	Kaninchen	Santa Cruz		
CBP	sc-583 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000	+
CBP (HAT)	6D6	Ratte IgG	E. Kremmer	1:30	(-)

### 2.10.2 Sekundärantikörper

Maus <i>anti-Ratte</i> IgG-L kappa (TIB172)	nicht konjugiert	E. Kremmer, München
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG (sc-2022)	AP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnol.
Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (S3721)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG Fc (S3731)	AP-Konjugat	Promega

Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG H+L (S3831)	AP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Kaninchen</i> IgG H+L (W4011)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Maus</i> IgG H+L (W4021)	HRP-Konjugat	Promega
Ziege <i>anti-Ratte</i> IgG u. IgM H+L (112-035-068)	HRP-Konjugat	Dianova
Esel <i>anti-Ziege</i> IgG H+L (705-035-147)	HRP-Konjugat	Dianova
Ziege <i>anti-Huhn</i> IgY Fc (GAYFC-HRP)	HRP-Konjugat	Genway Biotech

## 2.11 Längenstandards

### 2.11.1 DNA-Größenstandards

1 kb DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas

Fragmentlängen in bp: 10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

100 bp DNA-Leiter (GeneRuler), MBI Fermentas

Fragmentlängen in bp: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

### 2.11.2 Protein- und Peptid-Molekulargewichtsmarker

SDS-PAGE Protein-Standards, BioRad:

	Mw. [kDa]	Hoher Bereich	Niedriger Bereich
Myosin	200 kDa	●	
β-Galaktosidase	116 kDa	●	
Phosphorylase B	97 kDa	●	●
BSA	66 kDa	●	●
Ovalbumin	45 kDa		●
Carboanhydrase	31 kDa		●
Trypsin Inhibitor	21.5 kDa		●
Lysozym	14.4 kDa		●

Peptidmassenstandard, Bruker (monoisotopische Massen in Da):

Bradykinin	757.3992
Angiotensin II	1046.5420
Angiotensin I	1296.6853
Substance P	1347.7361
Bombesin	1619.8230
Renin Substrat Tetradecapeptid	1758.9326
ACTH clip 1-17	2093.0868
ACTH clip 18-39	2465.1990
Somatostatin 28	3147.4714

## 2.12 Prokaryotische Zellkultur

*Escherichia coli* wurde in sterilen Glas- und Kunststoffgefäßen bei 37 °C und guter Belüftung kultiviert. Einzelne Kolonien auf Platten wurde mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen in Flüssigmedien übertragen. Als Standardmedium für Proteinexpression diente das LB-Medium, ein sogenanntes komplexes Medium, das eine Vielzahl von Mineralstoffen, Kohlenstoff- und Energiequellen enthält. In Abhängigkeit von den Resistenzgenen auf verwendeten Plasmidvektoren wurden Antibiotika zugegeben. Sowohl Kulturplatten als auch Flüssigkulturen waren nach ca. 16 h Inkubation ausreichend bewachsen.

Zur zeitlich unbegrenzten Aufbewahrung von *E. coli* wurde ein Aliquot einer gut bewachsenen Flüssigkultur mit einem Volumen 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei - 80 °C gelagert.

LB-Medium	1 % (w/v) Bactotrypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl für Kulturplatten wurden 1.5 % (w/v) Bacto-Agar zugegeben
Ampicillin 1000x	100 mg/ml in Ethanol, -20 °C
Chloramphenicol 1000x	34 mg/ml in Ethanol, -20 °C

### 2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Der Bakterienstamm wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und mit einer einzelnen Kolonie eine Vorkultur in 25 ml TYM-Medium für die Inkubation über Nacht angesetzt. Mit der Vorkultur wurden 500 ml TYM angesetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 inkubiert. Die Kultur wurde in einem Eis/Kochsalzbad zügig auf 0 °C abgekühlt und bei 4000 U/min und 0 °C im JA10 Rotor 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 ml eiskaltem TfBI vorsichtig resuspendiert und anschließend wie oben in 8 min abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 20 ml eiskaltem TfBII aufgenommen und in Aliquots von 100 µl auf gekühlte Mikroreaktionsgefäße verteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

TYM-Medium	2 % (w/v) Bactotrypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 100 mM NaCl 10 mM MgSO <sub>4</sub>
TfBI	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl 10 mM MgSO <sub>4</sub>

TfBI	10 mM MOPS (pH 7.0 RT) 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 10 % (v/v) Glycerin
MgSO <sub>4</sub> -Stammlösung:	1 M, steril filtrieren; wird dem TYM-Medium erst nach dem Autoklavieren zugefügt
MnCl <sub>2</sub> -Stammlösung:	1 M, steril filtrieren; wird dem TfBI-Puffer erst nach dem Autoklavieren zugefügt

## 2.13 Eukaryotische Zellkultur

### 2.13.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Arbeiten an eukaryotischen Zelllinien erfolgten grundsätzlich in einer Zellkulturwerkbank unter sterilen Bedingungen. Jurkat- und RCC-Zellen wurden in RPMI1640 Medium supplementiert mit 10 % (v/v) FCS (30 min bei 56 °C behandelt), 1000 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert. Die Bedingungen im Inkubator wurden auf 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchte eingestellt.

Jurkat-Zellen wachsen in Suspension und wurden in einer Dichte von 0.2-0.8 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Zellkulturflasche und Spinnergefäßen kultiviert. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt und in Abständen von 24-48 h mit vorgewärmten Zellkulturmedium auf den unteren Wert von 0.2-0.3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt.

RCC-Zellen wachsen adhärent und wurden auf Zellkulturplatten unterschiedlicher Größe kultiviert. Bei geschätzten 90 % Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf neue Platten verteilt. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und ca. 1/10 des üblichen Medienvolumens an Trypsin/EDTA 1X hinzugefügt. Nach zwei bis fünf Minuten Inkubation bei 37 °C lösten sich die Zellen und konnten mit Zellkulturmedium von der Oberfläche gewaschen werden. Bei der Verteilung auf die neuen Platten durfte das Verdünnungsverhältnis 1:2 bei RCC26 und 1:5 bei RCC53 nicht überschritten werden.

### 2.13.2 Isolierung primärer T-Lymphocyten

Humane PTL wurden aus „Buffy coats“ d.h. Lymphocyten-reichen Fraktionen des Blutes gewonnen. Das Material wurde mit einem Volumen PBS/1mM EDTA verdünnt und sehr vorsichtig auf 20 ml Ficolllösung (Dichte 1.077 g/ml) geschichtet. Die Auftrennung erfolgte in der Tischzentrifuge für 30 min bei 1800 g, 22 °C und minimaler Bremsstufe. Die T-Lymphocyten befinden sich zusammen mit B-Lymphocyten und Monocyten in einer Interphase, erkennbar als „Grauschleier“.

Erythrocyten und Granulocyten befinden sich im Sediment, während sich in der oberen Phase das Blutplasma mit den Blutplättchen befindet.

Die Interphase wurde möglichst vollständig mit einer Pipette abgenommen, gesammelt und die Zellen dreimal in PBS/1mM EDTA gewaschen. Anschließend konnten die Zellen in Medium resuspendiert und mit einer Dichte von  $1.5 \times 10^6$  Zellen/ml in Zellkulturflaschen überführt werden. Die Kulturbedingungen entsprachen denen für Jurkat-Zellen, wenngleich primäre Zellen nur wenige Tage in Kultur gehalten wurden. Da die Monocyten unter diesen Bedingungen adhären, konnten sie durch Dekantieren der Zellsuspension abgereichert werden.

### 2.13.3 Stimulierung primärer T-Lymphocyten

Die Aktivierung von T-Lymphocyten kann *in vitro* u.a. durch Vernetzen der Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Phytohemagglutinin und durch Induktion des PKC-Signaltransduktionsweges durch den Phorbolster PMA bewirkt werden. Es wurden 2.5 µg/ml PHA in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 20 ng/ml PMA gelöst in EtOH dem Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen für einen definierten Zeitraum bei Kulturbedingungen inkubiert.

## 2.14 Zellfraktionierung

### 2.14.1 Jurkat und RCC-Kernextrakte (NAM-Protokoll)

Es können Suspensions- und adhären Zellen fraktioniert werden. Die Jurkat-Zellen, aus denen die Kernextrakte hergestellt werden sollen, wurden bei einer Dichte von  $3-8 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (500 g, 15 min, 4 °C), und die Pellets mit 50 ml an PBS in ein 50ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Adhären Zellen wurden nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, in einem kleinen Volumen PBS mit einem Zellschaber suspendiert und in ein 50 ml–Gefäß gegeben.

Durch erneute Zentrifugation (500 g, 8 min) wurde der restliche Überstand quantitativ entfernt. Das Volumen des Sedimentes (PCV, *packed cell volume*) wurde bestimmt.

Alle weiteren Schritte, einschließlich der Zentrifugationsschritte, wurden generell auf Eis bzw. 4 °C durchgeführt. Nach dem Abnehmen des überstehenden Puffers wurde das Pellet in 4 PCV Niedrigsalzpuffer (Puffer A) aufgenommen und die Zellen solange auf Eis inkubiert, bis sie in dem hypotonischen Puffer angeschwollen waren. Dieser

Vorgang wurde durch regelmäßige Kontrolle im Lichtmikroskop überprüft und nahm normalerweise etwa 15-30 min in Anspruch.

Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (500 g, 8 min), das Volumen der geschwollenen Zellen (SCV, *swollen cell volume*) bestimmt und 2 SCV Puffer A hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Wheaton 7 ml) mit lose sitzendem Pistill (*loose*) überführt und homogenisiert. Das Ergebnis wurde im Lichtmikroskop überprüft. Es wurde zentrifugiert (1800 g, 15 min), der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Präparation der löslichen cytoplasmatischen Proteine wurde dieser Überstand mit 11 % (v/v) 10 x S100-Puffer versetzt und durch Ultrazentrifugation (100000 g, 1 h) von unlöslichen Membranresten und Organellen befreit (Fraktion „S100“). Bei kleinen Mengen und geringem Interesse an der cytoplasmatischen Fraktion konnte die Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 16000 g erfolgen.

Die Zellkerne wurden in einem kleinen Volumen Puffer A resuspendiert und vorsichtig auf 30 ml 1.8 M Sucrose-Lösung in Puffer A pipettiert. Anschließend wurden die Kerne 45 min bei 30000 g im Ausschwingrotor (Beckman, SW41, 13000 rpm) zentrifugiert, um cytoplasmatische Proteine und Zellorganellen zu entfernen, welche von der Sucrose in Schwebe gehalten wurden. Die Sucrose wurde durch einen weiteren Waschschrift mit mindestens 10 Kernpelletvolumen (NPV, *nuclear pellet volume*) Puffer A entfernt. Alternativ zur Reinigung im Sucrose-Kissen konnten die Kerne zweimal in 20 NPV Puffer A gewaschen werden.

Die Kerne wurden in einem halben NPV Puffer A resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde innerhalb von 10 min langsam unter vorsichtigem Mischen 1.5 NPV Hochsalzpuffer (Puffer C) zugetropft. Nach weiteren 60 min Inkubation auf dem Drehrad wurde der Extrakt abzentrifugiert (1800g, 10 min). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (18000 g, 30 min) um unlösliche Bestandteile zu entfernen (Fraktion „NE210“). Die Kerne wurden anschließend in 10 NPV einer Mischung aus gleichen Teilen Puffer A und Puffer C gewaschen. Die cytoplasmatische Fraktion, der Kernextrakt und die extrahierten Kerne wurden bei - 80 °C eingefroren.

Zur Extraktion von Proteinen aus dem Chromatin wurde das auf Eis aufgetaute Kernpellet in 2.8 NPV (s.o.) kaltem CSK-Puffer A resuspendiert und nach Zugabe von

0.6 mg/ml DnaseI (EK) für 30 min bei RT im Schüttler inkubiert. Das hinzugefügte Volumen sollte 3 NPV betragen, ggf. wurde mehr CSK A hinzugegeben.

Anschließend wurde 1 NPV CSK-Puffer B zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (18000 g, 30 min) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Fraktion „LCHR“).

Das Protokoll (ursprünglich aus He et al. 1990) wurde im Verlauf dieser Arbeit modifiziert. Die Bedingungen des Chromatinextraktes wurden den Bedingungen des Kernextraktes (ca. 210 mM NaCl) angelehnt. So wurde sichergestellt, daß gegenüber dem Kernextrakt zusätzlich auftretende Proteine allein durch die enzymatische Wirkung der DNaseI extrahiert wurden. Die extrahierten und gewaschenen Zellkerne wurden hierzu in 2 NPV einer Mischung aus gleichen Teilen Puffer A und Puffer C aufgenommen. Nach Hinzufügen der DNaseI wurde 1 h bei 4 °C inkubiert und der Chromatinextrakt analog dem Kernextrakt durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen befreit.

Niedrigsalzpuffer A	10mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl
Sucrose-Lösung	10mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 1.8 M Sucrose
Hochsalzpuffer C	20 mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 25 % (v/v) Glycerin 420 mM NaCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
10X S100 Puffer	30 mM MgCl <sub>2</sub> 300 mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 1400 mM KCl
CSK A	10 mM PIPES (pH 6.8 RT) 50 mM NaCl 300 mM Saccharose 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 0.5 % (v/v) Triton-X100
CSK B	10 mM PIPES (pH 6.8 RT) 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mM NaCl 300 mM Saccharose 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA

Zu allen verwendeten Puffern frisch zugegeben:

1 mM PMSF, 1 mM Benzamidine, 1mM TPCK, 1 mM DTT, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM NaF

### 2.14.2 Fraktionierung von Hela-Zellen

Hela-Zellkerne wurden von 4C/Cilbiotech, Mons, Belgien bezogen. Sie wurden in einem halben NPV Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Über einen Zeitraum von 30 min ließ man unter Rühren ein halbes NPV Hochsalzpuffer eintropfen (EK etwa 400 mM KCl). Nach weiterem Rühren von 30 min Dauer wurde die Lösung abzentrifugiert (40000 g, 30 min). Der klare Zellkernextrakt wurde in Dialyseschläuche überführt und solange gegen BC0 (pH 6.8 RT) dialysiert, bis die Leitfähigkeit von BC100 erreicht war. Präzipitiertes Protein wurde anschließend durch Zentrifugation bei 40000 g entfernt.

Aus den extrahierten Kernen konnte mittels Nuclease ein Extrakt chromatinbindender Proteine hergestellt werden. Die Bedingungen wurden analog zur Kernextraktion gewählt, wobei der Glycerinanteil auf 10 % (v/v) gesenkt wurde um den enzymatischen Abbau des Chromatins nicht zu inhibieren.

Die extrahierten Zellkerne wurden zweimal in einem NPV Chromatinextraktpuffer gewaschen und schließlich in einem NPV aufgenommen. Es wurde DNaseI zu einer EK von 0.25 mg/ml hinzugefügt und 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Chromatinextrakt wurde analog dem Kernextrakt zentrifugiert und dialysiert.

Niedrigsalzpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 6.8 RT) 25 % (v/v) Glycerin 20 mM KCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
Hochsalzpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 6.8 RT) 25 % (v/v) Glycerin 1600 mM KCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
Chromatinextraktpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 6.8 RT) 10 % (v/v) Glycerin 400 mM KCl 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 0.2 mM EDTA
DNaseI-Stammlösung	10 mg/ml DNaseI (ca. 25000-30000 U/ml) 10 mM HEPES (pH 7.5 RT) 10 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 % Glycerin



## 2.15 Chromatographie

### 2.15.1 Umgang mit Chromatographie-Säulenmaterialien und praktische Grundlagen der Affinitätschromatographie

Die Säulenmaterialien für die Immunaффinitätschromatographie und die Aufreinigung von GST-Proteinen befinden sich üblicherweise in einer Konservierungslösung, die vor Verwendung entfernt werden muss. Dies geschah durch Zentrifugation und mindestens zwei Waschschriffe in 50 Volumina des Puffers des nachfolgenden Experimentes (Equilibrationsschritt). Säulenmaterialien wurden grundsätzlich mit 500 g und bei 4 °C zentrifugiert, um Beschädigung zu verhindern.

Um den Verlust von Protein und Säulenmaterial zu begrenzen, wurde grundsätzlich mit silikonisierten Gefäßen gearbeitet und in der Mehrheit der Fälle wurde das Detergenz Igepal CA630 (NP-40) zu 0.05 % (v/v) hinzugefügt, das die Oberflächenspannung verringert und unspezifische Adsorption an Gefäße und Säulenmaterial verhindert.

Die Bedingungen in der Affinitätschromatographie wurden dahingehend optimiert, unspezifische Bindungen zu minimieren, eine hohe Ausbeute an Produkt zu erzielen und eventuell Proteinkomplexe in ihrer Zusammensetzung zu bewahren.

Falls möglich wurde hierzu das optimale Verhältnis von Säulenmaterial zum Zielprotein in der flüssigen Phase ermittelt. Eine möglichst hohe Ionenstärke diente dazu, unspezifische ionische Wechselwirkungen zu verringern.

### 2.15.2 Phosphocellulose-Säulenchromatographie

Phosphocellulose ist ein faseriges Säulenmaterial, das einen Orthophosphatrest als funktionelle Gruppe besitzt und als Kationenaustauscher wirkt. Zudem bindet es Enzyme (ATPasen), die Reaktionen an Phosphatgruppen/ATP katalysieren.

Das Säulenmaterial wurde nach Angaben des Herstellers durch Inkubation mit nacheinander 0.5 M NaOH und 0.5 M HCl und zwischenzeitlichen Waschschriffen in Wasser vorbereitet. Anschließend wurde das Material mit 1 M Tris (pH 7.3 RT) auf den pH-Wert der Aufreinigung eingestellt und schließlich mit BC100 equilibriert. Die Aufreinigung wurde in einer Säule mit 50 mm Innendurchmesser durchgeführt, welche an eine P1 Schlauchpumpe angeschlossen wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten bei einer Flußgeschwindigkeit von einem SV pro Stunde.

Der Hela-Zellkernextrakt wurde durch Dialyse gegen BC0 (pH 6.8 RT) auf 100 mM KCl eingestellt und auf die Säule geladen, so daß die Kapazität der Säule von ca.

10 mg/ml nicht überschritten wurde. Der Durchlauf wurde nach ca. 1 SV in mehreren Fraktionen aufgefangen. Nach einem Waschschrift in 3 SV BC100 wurden nacheinander vier Elutionsschritte durchgeführt. Es wurde schrittweise mit BC300, BC500, BC850 und BC1200 eluiert und Fraktionen gesammelt bis die Proteinkonzentration im Eluat deutlich abgesunken war.

Auf die Elutionsschritte bei 300 und 500 mM KCl folgte ein Waschschrift von 3 SV des entsprechenden BC-Puffers, um eine exakte Trennung der Fraktionen zu gewährleisten. Die Fraktionen einer Ionenstärke mit dem höchsten Proteingehalt wurden vermengt, um eine größere Menge Material einheitlicher Zusammensetzung zu erhalten.

### **2.15.3 Immunaффinitätschromatographie**

#### **2.15.3.1 Antikörperkopplung**

Für die Immunaффinitätschromatographie wurden die Antikörper an immobilisiertes Protein G gekoppelt (Harlow und Lane 1999). Protein G ist ein 30 kDa-Polypeptid, das spezifisch und mit hoher Affinität die konstante Region (Fc) der IgG-Antikörper bindet und dabei die antigen-bindende variable Region exponiert läßt. In der Mehrheit der Fälle wurde der Antikörper mit einem Quervernetzer an das Protein G kovalent gebunden, um das Auftreten der Antikörperfragmente in weiterführenden Experimenten zu verhindern.

Zur Kopplung des Antikörpers wurde Protein G-Sepharose 2 h mit 50-100 SV Hybridom-Überstand auf dem Rollenschüttler bei RT inkubiert.

IgM-Antikörper werden von Protein G nicht direkt gebunden, können aber über ihre leichte Kette an einen primären Antikörper gekoppelt werden. Es wurde daher ein anti-Kappa-leichte-Kette IgG (TIB172) wie oben beschrieben direkt an die Säule gekoppelt und nach einem Waschschrift mit 50 Säulenvolumina (SV) PBS der IgM-haltige Hybridom-Überstand zur Bindung an den primären Antikörper hinzugefügt.

Nach der Säulenkopplung wurde der immobilisierte Antikörper mit 50 SV PBS gewaschen und entweder mit 9 SV PBS/0.05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  konserviert oder wie unten beschrieben quervernetzt.

Das Säulenmaterial wurde zweimal mit 10 Volumina 0.2 M Natriumborat (pH 9.0 RT) gewaschen. und in der gleichen Menge resuspendiert. Zur Quervernetzung des

Antikörpers an die Matrix wurde pulverförmiges Dimethylpimelimidat zu einer EK von 20 mM hinzugegeben und 30 min bei RT geschüttelt.

Die Reaktion wurde durch Waschen mit 10 SV 0.2 M Ethanolamin (pH 8.0 RT) und anschließende Inkubation in der gleichen Menge für 2 h bei RT abgebrochen.

Die Säule wurde in 10 SV PBS/0.05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  gewaschen und in der gleichen Menge bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.15.3.2 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen**

Das Säulenmaterial wurde equilibriert und mit dem Extrakt oder einer anderen komplexen Proteinmischung, die das gewünschte Protein enthielt, vermischt. Es wurde 2-5 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt und durch drei bis fünf Waschschriffe mit einem Gesamtvolumen von 100-300 Säulenvolumina von unspezifisch gebundenen Verunreinigungen befreit. Hierbei war es sinnvoll erst mit einem Salzgehalt in der Molarität des Extraktes zu waschen, dann Waschschriffe mit einem erhöhten Salzgehalt und damit höherer Stringenz durchzuführen und in Abhängigkeit von weiteren experimentellen Schritten durch einen letzten Waschschriff die Salzkonzentration wieder zu senken. Die hierbei anwendbaren Bedingungen mussten experimentell bestimmt werden. Viele Antikörper-Antigen-Bindungen sind bis 1000 mM KCl und darüber hinaus stabil.

Eine bessere Aufreinigung konnte auch mit einem hohen Salzgehalt bei der Bindung des Proteins erzielt werden, da bei niedriger Ionenstärke z.B. weniger als 200 mM KCl unspezifisch gebundene Proteine durch das Waschen des Säulenmaterials häufig nicht vollständig entfernt wurden.

### **2.15.3.3 Peptidelution**

Proteine, die spezifisch an einen monoklonalen Antikörper gebunden sind, können häufig mit einem Peptid eluiert werden, das die Sequenz des Epitops beinhaltet. Die milden Elutionsbedingungen erlauben die Gewinnung von Proteinen und Proteinkomplexen in nativer Form.

Das Epitop der MED15/PAQ-Antikörper 1H7 und 6C9, sowie des MED25/ACID1-Antikörpers 9C2 wurde mit Hilfe von Peptidarrays ermittelt, auf denen sich die Sequenz des Zielproteins in überlappenden Abschnitten befand.

Zur Elution wurde das Peptid in einem Puffer mit geringer Stringenz aufgenommen, z.B. BC100, 0.05 % (v/v) NP-40, 0.2 mM DTT.

Die Konzentration des Peptides wurde auf 0.2-1 mg/ml eingestellt. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml befand sich das Peptid in vierzigfachem Überschuß gegenüber dem Antikörper bei folgenden Annahmen: 1 mg Antikörper/ml Säule; Elutionsvolumen 1ml; Mw. (Antikörper)~160 kDa, bivalent, Mw. (Peptid) ~ 2 kDa.

Die Elution erfolgte bei 4 °C innerhalb von 3-4 h bzw. über Nacht.

#### **2.15.4 Heterologe Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* und Aufreinigung**

Zur Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen wird die sehr stabile Bindung der Glutathion-S-Transferase-Gruppe des Fusionsproteins an sein Substrat Glutathion ausgenutzt. Das Glutathion befindet sich hierbei in immobilisierter Form auf einer Sepharose-Matrix. Nach einigen Waschschritten z.T. bei sehr hohen Salzkonzentrationen wird durch Zugabe von reduziertem Glutathion diese Bindung unter milden Bedingungen wieder aufgehoben.

In 500 ml LB-Medium wurden 25 ml einer Übernachtskultur gegeben. Die Bakterien wurden im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8 vermehrt und die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG (EK) induziert. Die Bedingungen der nachfolgenden Proteinexpression wurden so gewählt, daß die Bildung von Einschlusskörpern minimiert wurde. Anwendbar sind Temperaturen zwischen 22 und 30 °C und Inkubationszeiten von drei bis sechs Stunden bei konstant 200 rpm. Im Anschluss an die Expression wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min und 4 °C geerntet.

Das Pellet wurde in 22 ml Lyse-Puffer gelöst und mit Ultraschall aufgeschlossen. Hierbei wurde eine Mikrospritze bei einer Amplitude von 35 % und einer Schallzeit von insgesamt 2 min verwendet. Die Kühlung erfolgte mit Eis oder Eis/NaCl/Ethanol-Mischungen und diente dazu die Temperatur des Lysates bei 0-5 °C zu halten. Die Intervalle der Beschallung wurden im Hinblick auf ausreichende Kühlung auf 0.3-0.6 s Ultraschall und 0.6 s Pause eingestellt. Das Lysat wurde bei 10000 g, 10 min, 4 °C von Zelltrümmern geklärt und es wurden DTT ad 2 mM und Triton X-100 ad 0.5 % (v/v) hinzugegeben. Zwischenzeitlich wurden 500 µl Glutathion-Sepharose in 50 ml Lysepuffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte wie bei allen weiteren Waschschritten bei 500 g und 4 °C.

Die equilibrierte Glutathion-Sepharose wurde mit dem Lysat auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C für 90 min inkubiert, um das Fusionsprotein an das Säulenmaterial zu binden. Anschließend wurde das Lysat nach Zentrifugation als

Überstand abgenommen und die Säule nacheinander in je 50 ml Lysepuffer, BC2000 und BC150 (BC x: jeweils 0.05 % (v/v) NP-40) gewaschen.

Die immobilisierten Fusionsproteine wurden in sequentiellen Elutionsschritten als vier separate Fraktionen gewonnen. Die erste Fraktion wurde mit 0.5 ml 20mM reduziertem Glutathion in Elutionspuffer durch Inkubation von 10 min bei 4 °C gewonnen. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten in gleicher Weise bei RT. Zur Qualitätskontrolle wurden jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen und 10 µl Lysat vor und nach der Inkubation mit Glutathion-Sepharose auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Das GST-Pol-II-CTD-Fusionsprotein konnte nur in geringen Mengen exprimiert werden. Wegen der vielfachen Wiederholung der Aminosäureabfolge wurde ein großer Überschuß verkürztes Protein gebildet. Die Erhöhung der IPTG-Konzentration auf 1 mM verbesserte das Verhältnis zugunsten des vollständigen Proteins. Außerdem konnte das korrekte Produkt durch Zugabe von 40 % (v/v) gesättigter Ammoniumsulfatlösung bevorzugt ausgefällt werden. Nach 30 min Inkubation auf Eis konnte es innerhalb von 30 min bei 16000 g abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde in BC100 aufgenommen. Etwa zehn Prozent des Gesamtproteins bestand aus dem korrekten Produkt.

Lyse-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 500 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 20 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
Elutionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8.0 RT) 25 mM Tris-HCl (pH 8.8 RT) 100 mM Natriumchlorid 20 mM reduziertem Glutathion (frisch hinzugegeben).

#### 2.15.4.1 Affinitätschromatographie mit GST-Fusionsproteinen („Pulldown“)

In dieser Arbeit wurden GST-Fusionsproteine von Importin  $\alpha$  und Pol-II-CTD ähnlich einem Antikörper für die Affinitätschromatographie eingesetzt. Das Importin  $\alpha$ -Fusionsprotein wurde analog 2.15.4 an die Säule gebunden und gewaschen. Die Beladung konnte mittels des Bradford-Assays überprüft werden. GST-CTD wurde als gereinigtes Fusionsprotein an die Säule gekoppelt.

Die Bedingungen der Chromatographie entsprachen denen der Immunaффinitätschromatographie. Weil das Fusionsprotein und seine Fragmente im Überschuß vorlagen, wurde in vielen Fällen auf eine Elution mittels Detergenz, niedrigem pH-Wert oder Glutathion verzichtet und stattdessen mit fünf

Säulenvolumina BC2000 ionische Wechselwirkungen zwischen Fusionprotein und Bindungspartner aufgehoben. Hierbei verblieb das Fusionsprotein vollständig auf dem Säulenmaterial..

## 2.16 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

### 2.16.1 SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen (0.1 % (w/v) SDS) über eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970).

Für SDS-Gele wurden Apparaturen von Hoefer/Amersham verwendet, ie. SE600 (13x15 cm), SE660 (20x15) und SE280 (Minigel). Polyacrylamid-Gele müssen unter Luftabschluss gegossen werden. Hierzu wurden zwei Glasplatten mit entsprechenden Abstandhaltern (0.75 bzw. 1 mm) in der Gießapparatur fixiert und die Trenngellösung eingefüllt. Zum oberen Rand wurde ein Abstand eingehalten, der der Größe des Kammes und einer zusätzlichen Laufstrecke von 1-1.5 cm entsprach. Zum Herstellen des Luftabschlusses und zur Glättung der Oberfläche wurde mit ca. 1 ml n-Butanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Butanol entfernt, die Sammelgellösung hinzugefügt und ein passender Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Geltaschen mit Wasser ausgespült und das Gel in die Laufapparatur eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TGS. Die Proben wurden mit entsprechenden Mengen 2x oder 6x Laufpuffer angesetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Falls erforderlich wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf-Tischzentrifuge, 1 min 14000 rpm, RT). Pro Geltasche wurden maximal 100 µg Protein aufgetragen (SE600, 1 mm Abstandhalter, Kamm mit 15 Taschen).

Die Auftrennung über Minigele erfolgte bei konstant 200 V über 1-2 Stunden ohne Kühlung. Die Hoefer-Kammern wurde mit einem Umlaufkühler auf ca. 10 °C gekühlt. Es wurde eine konstante Stromstärke von 30-70 mA pro Gel angelegt. Der Lauf wurde beendet, wenn die durch Bromphenolblau gefärbte Laufront ca. 5 mm vom unteren Rand entfernt war.

2X Probenpuffer	0.125 M Tris-HCl (pH 6.8 RT)
	4 % (w/v) SDS
	20 % (v/v) Glycerin
	2 % (v/v) β-Mercaptoethanol,
	0.02 mg/ml Bromphenolblau

6X Probenpuffer	0.35 M Tris-HCl (pH 6.8 RT)
	10 % (w/v) SDS
	30 % (v/v) Glycerin
	9.3 % (w/v) DTT
	0.12 mg/ml Bromphenolblau

	<b>Trenngel 10 % (170:1)</b>	<b>12 % (170:1)</b>	<b>15 % (170:1)</b>	<b>Sammelgel</b>
H <sub>2</sub> O	7.5 ml	15 ml	10 ml	12.2 ml
30 % (w/v) Acrylamid	6.7 ml	20 ml	25 ml	2.6 ml Gel 30
2 % (w/v) Bisacrylamid	0.74 ml	1.75 ml	2.2 ml	(37.5:1)
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8 RT)	5 ml	12.5 ml	12.5 ml	5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8 RT)
10 % (w/v) SDS	0.2 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.2 ml
10 % (w/v) APS	100 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl

### 2.16.2 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur zweidimensionalen Auftrennung von Proteingemischen wurden immobilisierte pH-Gradienten-Gele (IPG) in Kombination mit SDS-PAGE-Gelen eingesetzt. Die Gele wurden z.T. selbst bzw. von der Toplab AG, Martinsried angefertigt.

#### 2.16.2.1 Probenvorbereitung

Komplexe Proteinmischungen waren häufig einer direkten Auftrennung in der ersten Dimension nicht zugänglich, da sie störende Ionen, Detergentien und andere niedermolekulare Verunreinigungen enthielten. Ziel der Probenvorbereitung war es, die Ionenstärke des Proteingemisches auf unter 10 mM zu verringern und die Proteine in den Probenpuffer für die erste Dimension zu überführen. Für die notwendige Diafiltration wurden Zentrifugal-Konzentrationsäulen Vivaspin 2 mit Polyethersulfon-Membrane MWCO 10000 Da (Vivascience) verwendet. Das Proteingemisch wurde bei 5000 g auf 20-50 µl eingeeengt und in zwei aufeinanderfolgenden Schritten wurde jeweils 500 µl IEF-Probenpuffer ohne Ampholyte hinzugefügt und erneut eingeeengt. Die Probe wurde im gewünschten Endvolumen IEF-Probenpuffer aufgenommen und durch Zentrifugation bei 3000 g in den Auffangbehälter der Säule verbracht. Es wurden die Ampholyte zu einer EK von 0.5 % (v/v) und DTT zu einer EK von 1 % (w/v) hinzugefügt und die Probe 30 min bei RT inkubiert.

2D-Probenpuffer	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	4 % (w/v) CHAPS
	1 % (w/v) DTT
	0.5 % (v/v) Ampholyte

### 2.16.2.2 Isoelektrische Fokussierung

Die Probe wurde in den IPG-Streifenhalter pipettiert und ein IPG-Streifen mit der Probe benetzt und hineingelegt. Anschließend wurde mit IPG Cover Fluid überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Streifenhalter wurden auf die Elektroden des IPGPhor-Netzgerätes gelegt und eine Rehydratationszeit von 12 h bei 20 °C programmiert. Während der nachfolgenden isoelektrischen Fokussierung wurde die elektrische Spannung nach folgendem Programm schrittweise erhöht:

500 V 1 h - 1000 V 1 h - 8000 V 40000 Vhr (Voltstunden) entsprechend ca. 5 h.

### 2.16.2.3 SDS-PAGE als zweite Dimension

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde das EttanDalt System verwendet, das einem eindimensionalen SDS-PAGE-System ohne Sammelgel entspricht.

Die Trenngellösung wurde bis ca. 1 cm unter den Rand der Glasplatten gegossen. Die IPG-Streifen der ersten Dimension wurden aus den Streifenhaltern entnommen und 15 min in SDS-Equilibrationpuffer inkubiert. Der Streifen wurde auf das Trenngel überführt und mit Agarose-Lösung fixiert. Es wurden wenige µl Molekulargewichtsmarker auf ein Filterpapier pipettiert und neben dem IPG-Streifen auf dem Trenngel fixiert. Die Proteine wurden bei einer Leistung von 5 W pro Gel / 45 min in das Trenngel überführt und der Lauf bei konstant 120 W und 20 °C durchgeführt.

SDS-Equilibrationpuffer	6M Harnstoff
	2% (w/v) SDS
	50 mM Tris-HCl (pH 8.8 RT)
	30% (v/v) Glycerin
	etwas Bromphenolblau
	1 % (w/v) DTT frisch dazugegeben



### 2.16.3 Gesamtproteinfärbung

Für die Färbung von Proteinen stehen zwei verschiedene Arten der Coomassiefärbung und die Silberfärbung zur Verfügung. Die Sensitivität der Silberfärbung liegt nach allgemeinen Erfahrungen bei etwa 1 ng Protein. Es ergeben sich je nach Aminosäurezusammensetzung unterschiedliche Farbtöne der Proteine, die einen Vergleich einzelner Banden erleichtern. Die Färbung mit Coomassie R250 ist mit geringerem Zeitaufwand durchzuführen, sie ist aber mit einer Nachweisgrenze von 100 ng weniger sensitiv als die Silberfärbung. Die Färbung mit kolloidalem Coomassie G250 hat eine Nachweisgrenze von 20 ng Protein. Beide Coomassie-Färbungen sind nach allgemeinen Erfahrungen besser für die Massenspektrometrie geeignet als die Silberfärbung, weil keine Aldehyde verwendet werden, die Aminogruppen in Lysin- und Arginin-Resten modifizieren können.

#### 2.16.3.1 Coomassie R250-Färbung

Das Gel wurde in einer Lösung von 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure für eine Stunde bei RT fixiert und gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure bis zur gewünschten Farbtintensität.

#### 2.16.3.2 Coomassie G250-Färbung (kolloidal)

Das Gel wurde über Nacht in der Färbelösung geschwenkt. Es wurde mit Wasser entfärbt bis der Hintergrund transparent war.

Färbelösung	0.08 % (w/v) CBB G250 1.6 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 8 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 % (v/v) Methanol
-------------	--

770 ml Wasser wurden mit 16 ml Phosphorsäure und 80 g Ammoniumsulfat versetzt. Es wurden 16 ml einer 5 % (w/v)-Lösung Coomassie G250 hinzugefügt. Unmittelbar vor der Färbung wurden 200 ml Methanol hinzugegeben.

#### 2.16.3.3 Silberfärbung

Für Silberfärbungen wurde das PlusOne-Kit (Amersham) nach Vorschrift eingesetzt. Um eine spätere massenspektrometrische Analyse zu ermöglichen, konnte auf die Verwendung von Glutaraldehyd und von Formaldehyd bis zur Entwicklung der Färbung verzichtet werden.

#### 2.16.4 Western Blot

Der Immunblot dient zur Identifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteinmischungen mit Hilfe von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Die Proteinmischung befindet sich hierbei aufgetrennt auf einer Membran. Es werden nacheinander ein primärer Antikörper, der spezifisch ein Protein erkennt und ein sekundärer Antikörper, der gegen die konstante Region des primären Antikörpers gerichtet ist, auf die Membran gegeben. Um die Bindung sichtbar machen zu können, ist an den sekundären Antikörper eine Enzymaktivität gekoppelt, i.e. Alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase (HRP).

Die Proteine wurden zunächst mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel und eine Nitrocellulose-Membran wurden dann für 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Elektroblotapparatur (BioRad). Hierzu wurden das Gel und die Membran zwischen zwei Metallelektroden und zwei Doppellagen in Transfer-Puffer angefeuchtetem Whatman 3MM Papier platziert. Es wurde für 45-60 min eine Spannung von 15 Volt (Minigel) bzw. 18 V (grosses Gel) angelegt. Neben der Nitrocellulose-Membranen wurden auch Membranen aus PVDF verwendet, die eine höhere Proteinkapazität und eine höhere mechanische und chemische Stabilität besitzen. Vor ihrer Verwendung wurde diese Membran durch kurzes Schwenken in Methanol und 5 min Inkubation in Wasser angefeuchtet und anschliessend analog der Nitrocellulose-Membran verwendet. Die Anfeuchtungsprozedur wurde nach jeder Trocknung der Membran wiederholt.

Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch eine Gesamtproteinfärbung mit 1x Ponceau S kontrolliert. Das Entfärben erfolgte in Wasser. Alternativ wurden die Proteine für ca. 5 min mit Amido Black gefärbt und durch Schwenken in Entfärber sichtbar gemacht. Die Amido Black Färbung ist wesentlich sensitiver, kann aber eventuell Epitope durch Bindung an Lysin- und Arginin-Reste maskieren.

Als erster Schritt der Immunodetektion wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran mit einem Überschuss an Protein abgesättigt. Die Membran wurde hierzu mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver bzw. 3 % (w/v) BSA in TBST für 1 h inkubiert. Für alle weiteren Schritte wurde ebenfalls TBST als Verdünnungs- und Waschpuffer verwendet. Der primäre Antikörper wurde für 1 h auf die Membran gegeben. Hierbei

haben sich Verdünnungen von 1:10 bis 1:50 bei Hybridomüberständen bzw. 1:1000 bei gereinigten Antikörpern bewährt. Es folgten drei Waschschrte in TBST mit einer Gesamtdauer von mindestens einer Stunde. Der sekundäre Antikörper wurden passend zum Primärantikörper und zur gewünschten Detektionsmethode gewählt. Eine Verdünnung von 1:5000 war ausreichend. Nach 45 min Inkubation folgten erneut drei Waschschrte von insgesamt mindestens 45 min Dauer.

Sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase wurden mit BCIP/NBT Lösung detektiert. Die Membran wurde dabei solange inkubiert bis das gewünschte Signal deutlich sichtbar war.

HRP-gekoppelte Antikörper wurden über Chemolumineszenz (ECL) nachgewiesen (Luminol-Oxidation). Die Membran lässt man dazu abtropfen und gibt sie in eine Mischung der zwei ECL-Reagenzien (Wasserstoffperoxid- und Luminolreagenz, Ecl-Kit, NEN). Die Membran wurde anschließend in Folie eingewickelt und ein Film damit belichtet (X-Omat, Kodak). Die Belichtungsdauer betrug je nach Intensität des Signals 3 s bis 20 min.

Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 0.05 % (w/v) SDS
10x Ponceau S:	2 % (w/v) Ponceau S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure
Amido Black Entfärbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Amido Black Färbelösung	0.1 % (w/v) Amido Black in Entfärbelösung
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP in 100 % DMF
NBT- Stammlösung	100 mg/ml NBT in 70 % (v/v) DMF
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 8.8 RT) 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BCIP/NBT-Färbelösung	0.0033 % (v/v) BCIP-Lösung 0.0066 % (v/v) NBT-Lösung . in AP-Puffer

### 2.16.5 Peptidarrays

Peptidarrays sind Membranen, auf denen direkt bestimmte Peptide bis zu 20 Aminosäuren Länge synthetisiert wurden. Die Möglichkeit, zahlreiche Peptide gleichzeitig und nebeneinander zu synthetisieren, kann insbesondere dazu verwendet werden, die Epitope monoklonaler Antikörper zu bestimmen.

Die einzelnen Peptid-Spots auf der Membran konnten mit einer geringen Menge Bromphenolblau in Dimethylformamid und anschließende Entfärbung in Wasser sichtbar gemacht werden. Das Bromphenolblau bindet dabei an die freien Aminogruppen des Peptides.

Peptidarrays wurden analog einer Western Blot Membrane verwendet. Die Menge an Peptid auf der Membran betrug mehrere Mikrogramm, so daß die Inkubationsschritte von primären und sekundären Antikörper auf 15 min gekürzt werden konnten.

### 2.16.6 Far Western Analyse

Bei einem *Far*-Western-Blot wird statt der Bindung eines primären Antikörpers an sein Antigen die Bindung von Proteinen an ihre Liganden sichtbar gemacht. Die Vorgehensweise ist analog der Immunodetektion auf Western-Blot-Membranen. Das Protein wurde in TBST zu einer Konzentration von 0.1-2 µg/ml verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Es wurde für mindestens eine Stunde mit TBST gewaschen. Das Protein konnte nun mit dem o.g. Protokoll für die Immunodetektion nachgewiesen werden. Es wurde ein primärer Antikörper verwendet, der gegen den Fusionsteil des Proteins gerichtet war.

Im Falle der Importin- $\alpha$ -Fusionsproteine wurde bei einem Teil der Experimente der erste Inkubationsschritt in TBST mit 500 mM NaCl, 1 % Milch und 2 mM DTT durchgeführt, um die Hintergrundfärbung der Membrane zu verringern. Es folgte ein Waschschrift mit TBST (500 mM NaCl, 2 mM DTT) von 45 min Dauer und ein Waschschrift mit TBST von 15 min Dauer um das DTT zu entfernen und die Salzkonzentration den weiterführenden Schritten anzupassen.

### 2.16.7 Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip und die Vorgehensweise der Immunfluoreszenzfärbung sind analog der Immunodetektion auf dem Western Blot. Sie dient dazu, die Lokalisation von Proteinen in Zellen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Der sekundäre Antikörper ist hierzu mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Präparate von Suspensionszellen wurden mit Hilfe Poly-L-Lysin beschichteter Objektträger angefertigt. Die Zellen wurden hierzu in PBS gewaschen und bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  auf den Objektträger aufgetragen, auf dem vorher Felder mit einem Fettstift eingegrenzt wurden. Nach 30 min bei 37 °C im Inkubator waren die Zellen adhäriert und konnten mit PBS gewaschen werden. Die Zellen wurden anschließend mit Methanol bei -20 °C für 2 min fixiert und permeabilisiert.

Alternativ konnten die Zellen mit 3 % (w/v) Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert werden. Das Paraformaldehyd wurde durch zweimaliges Waschen in PBS und durch dreißigminütige Inkubation in 2 % (w/v) Glycin/PBS entfernt bzw. neutralisiert. Die Zellen wurden danach mit 0.2 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert und in PBS gewaschen.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde 0.2 % (v/v) Fisch-Gelatine (v/v) in PBS auf die Zellen aufgetragen und 10 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde unverdünnt oder in PBS verdünnt aufgetragen und es wurde 1 h bei 37 °C und bei hoher Luftfeuchtigkeit (sogenannte feuchte Kammer) inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBS wurde der sekundäre Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung aufgetragen, und es wurde bei RT für 30 min inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist lichtempfindlich, so daß dieser und alle weiteren Schritte in abgedunkelten Gefäßen stattfanden. Es folgten drei bis vier Waschschrritte in PBS bevor ein Eindeckmedium auf den Objektträger gegeben wurde und ein Deckgläschen aufgelegt wurde. Die Präparate konnten anschließend im Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop analysiert werden.

## **2.17 Proteinidentifizierung mittels MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie**

Proteine wurden mit den Bruker Reflex III MALDI-TOF und AB Proteomics Analyzer 4700 Massenspektrometern identifiziert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, tryptisch verdaut und die im Massenspektrometer bestimmten Peptidmassen mit der Datenbank abgeglichen, um eine Identifizierung vorzunehmen. Das Enzym Trypsin schneidet mit hoher Spezifität ausschließlich C-terminal von Lysin- und Arginin-Resten, so daß man die zu erwartenden Peptidmassen aller bekannten Proteine bereits vorausberechnen kann. Die MASCOT-Datenbank enthält die entsprechenden Daten für alle humanen und viele andere Proteine.

### 2.17.1 Trypsin-Spaltung von Proteinen

Bei der Vorbereitung der Trypsin-Spaltung musste sehr auf Sauberkeit aller Gefäße und Lösungen geachtet werden, da kleinste keratinhaltige Haut- und Staubpartikel eine Identifizierung unmöglich machen könnten. In den meisten Spektren waren die tryptischen Peptide des Keratins zu sehen, so daß auf einen hohen Anteil spezifischer Peptide gegenüber kontaminierenden Peptiden hingearbeitet werden musste.

SDS-Gele für die Massenspektrometrie wurden mit Coomassie R250 oder G250 gefärbt. Die gewünschte Bande wurde mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten, in ein silikonisiertes 0.6 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Überschuss an Acetonitril entwässert. Je nach Proteinmenge wurden 50-100 ng modifiziertes Trypsin in 5 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt und auf das Gelstück gegeben. Nachdem das die Flüssigkeitsmenge vollständig von dem Gel aufgenommen worden war, wurde das Gelstück knapp mit Puffer bedeckt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die tryptischen Peptide mit der Pipette abgenommen und die im Gel verbliebene wässrige Lösung mit 50 µl 70 % (v/v) Acetonitril extrahiert. Die Fraktionen wurden zusammengeführt und im Zentrifugaltrockner unter Vakuum eingedampft. Die Peptide wurden entweder in 20 % (v/v) Acetonitril, 0.1 % (v/v) TFA aufgenommen und direkt analysiert bzw. vorher entsalzt.

### 2.17.2 Entsalzung von Peptiden mittels RP-Chromatographie im Mikromaßstab

Tryptische Peptidgemische waren häufig einer direkten Analyse nicht zugänglich, da verbliebenes Salz d.h. nicht hydrolysiertes Ammoniumhydrogencarbonat die Bildung von Matrixkristallen bzw. die Ionisation der Peptide störte. Für die Entsalzung der Peptidproben wurden mit C18-Säulenmaterial beladene Pipettenspitzen (ZipTip, Millipore) verwendet. Die Peptide wurden in 0.1 % (v/v) TFA aufgenommen. Eine ZipTip-Pipettenspitze wurde zweimal mit je 10 µl 50 % (v/v) Acetonitril equilibriert und anschließend die Peptide durch zehnmaliges pipettieren gebunden. Das Säulenmaterial wurde in drei Schritten mit jeweils 10 µl 0.1 % (v/v) TFA gewaschen. Für die Elution wurden 2 µl 50 % (v/v) Acetonitril mit der Spitze aufgenommen und in einem neuen Mikroreaktionsgefäß fünfmal durch das Säulenmaterial pipettiert.

### 2.17.3 Vorbereitung der Matrix und MALDI-Massenspektrometrie

Es wurden zwei verschiedenen Matrices verwendet:

DHB-Matrix aus 9 Teilen 20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure und einem Teil 20 mg/ml 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure gemischt oder 20 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-Zimtsäure in Aceton. Unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation entfernt.

Die Peptidlösungen und die Matrix wurden zu gleichen Teilen vermischt und auf die MALDI-Targetplatte pipettiert. Während des Trockenvorganges von etwa 20 min kristallisierte die Lösung ausschließlich auf der hydrophil beschichteten Fläche in der Mitte des Auftragspunktes.

Die Messungen erfolgten nach Anleitung des Herstellers bei positiver Ionisierung. Das Gerät wurde mit einem Peptidmassenstandard (Bruker) jeweils für die vier benachbarten Probenpunkte auf der Target-Platte kalibriert. Für jede Probe und den Standard wurden drei bis fünf Spektren von unterschiedlichen Stellen des Kristalls aufgenommen und addiert. Diese Vorgehensweise stellte sicher, daß Unebenheiten der Target-Platte und der Kristalle selbst nicht zu einer Verfälschung der Messwerte führten.

Von jeder Probe wurde eine Liste der monoisotopischen Peptidmassen erstellt und unter Angabe einer Toleranz von 150-250 ppm an die Mascot-Datenbank versendet.

Das Ergebnis enthielt eine Liste von Proteinen, die für die gemessene Probe infrage kamen, für das jeweilige Protein die gefundenen Peptide und ihre Abweichung vom theoretischen Wert. Daraus berechnete sich eine Punktzahl (Mascot-Score). Ab ca. 70 Punkten konnte eine Bestimmung als signifikant angesehen werden. Darüber hinaus konnten pI und Molekulargewicht des Proteins zur Beurteilung des Ergebnisses herangezogen werden. In hochgereinigten Proben konnten auch niedrige Punktzahlen oder das Auffinden eines einzigen Peptides als eindeutige Bestimmung angesehen werden.

## 2.18 DNA-Klonierungstechniken

### 2.18.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Grössentrennung von Plasmiden und PCR-Fragmenten sind horizontale Agarosegele von 0.6 bis 2.0 % (w/v) Agarose in TBE bzw. TAE geeignet. Um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 0.3  $\mu$ g/ml (EK) Ethidiumbromid

hinzugefügt. Proben wurden in 1x Auftragspuffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TBE oder TAE Laufpuffer bei einer Spannung von 50-110 V.

Die Größe der Fragmente wurde mit Hilfe geeigneter Größenstandards abgeschätzt.

### 2.18.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Soweit es für die Klonierungsstrategie erforderlich war, wurden Restriktionsschnittstellen oder Codons für zusätzliche Aminosäuren an den 5'-Enden der Primer-Oligonukleotide hinzugefügt und wurden durch die Amplifikation Bestandteil des Produktes.

Analytische PCR-Reaktionen wurden mit *Taq*-Polymerase durchgeführt, während Fragmente für die Subklonierung mit der *Pfu* Polymerase amplifiziert wurden. Die *Pfu* Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq* Polymerase eine 3' zu 5' Korrekturlese-Exonuclease-Aktivität, die die Sequenzgenauigkeit der Reaktion erhöht. Eine weitere Möglichkeit die Genauigkeit der Reaktion zu erhöhen, war eine Verringerung in der Zahl der effektiven Zyklen durch den Einsatz größerer Mengen der Matrice.

Ein typischer PCR-Ansatz von 50 µl enthielt 10 pmol beider Primer, 1-100 ng Template DNA, 5 µl 10x PCR Puffer, 0.2 mM dNTPs, 1 U *Taq* oder *Pfu* DNA Polymerase. Die Temperaturzyklen wurden von einem Thermocycler durchgeführt. Ein typisches Programm lautete wie folgt:

Erster Denaturierungsschritt: 3 min 95 °C

25 Zyklen bestehend aus: Denaturierung 45 s 95 °C

Hybridisierung der Primer 45 s 52-65 °C

(ca. 4 °C geringer als Annealingtemperatur der Primer)

Elongation 60 s 72 °C

Abschließende Elongation: 10 min 72 °C.

Die Elongationszeit ist hier nur als Beispiel angegeben und wäre sinnvoll für die Amplifikation von Sequenzen < 1000 bp mit der *Taq*-Polymerase. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine Syntheserate von mindestens 2 kb/min und die *Pfu*-Polymerase von mindestens 0.5 kb/min, woraus sich die minimal notwendige Elongationszeit ergibt.



### 2.18.3 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonucleasen wurden verwendet, um Fragmente aus Plasmiden auszuschneiden und um PCR-Fragmente mit sogenannten klebrigen Enden d.h. 5'- oder 3'-Überhängen zu versehen. Die Angabe der Enzym-Aktivität in U bezieht sich auf die Spaltung von 1 µg DNA in 1 h. Diese Raten werden in der Praxis meist nicht erreicht, z.B. bei überspiralisierten Plasmiden. Daher wurde in allen Restriktionsspaltungen ein zehnfacher Überschuß von Enzym bzw. Inkubationszeit angestrebt. Eine Spaltung konnte mit zwei Enzymen gleichzeitig durchgeführt werden, doch musste darauf geachtet werden, daß der Reaktionspuffer mit beiden Enzymen kompatibel war und daß der Volumenanteil der Enzymlösungen 10 % nicht überschritt.

Für die Reaktionsansätze wurden die Puffersysteme der Firmen NEB und MBI verwendet. Es wurde ein für alle in der Reaktion verwendeten Enzyme anwendbarer Puffer ausgewählt und in 1x Verdünnung eingesetzt.

### 2.18.4 Gelextraktion und DNA-Reinigung über Ionenaustauschersäulen

Nach einer enzymatischen Modifikation von DNA wurde diese mit Hilfe von GFX-Ionenaustauscher-Säulen (Amersham) aufgereinigt. Ein Restriktionsansatz wurde in 500 µl „*Capture-Buffer*“ auf die Säule gegeben. Durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 s wurde die DNA an die Säule gekoppelt. Danach wurde auf die gleiche Weise ein Waschschriff mit 500 µl „*Wash-Buffer*“ durchgeführt. Die DNA wurde mit 40 oder 50 µl TE-Puffer durch Zentrifugation eluiert. Auf diese Weise wurden Salze, Proteine und DNA-Fragmente unter ca. 100 bp entfernt.

Zur Abtrennung von größeren DNA-Fragmenten wurde das gewünschte Fragment zuerst aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten und im gleichen Volumen „*Capture-Buffer*“ durch 10 min Inkubation bei 60 °C aufgelöst. Die weitere Aufreinigung erfolgt wie oben beschrieben. Dieses Verfahren der Gelextraktion wurde zur Reinigung von PCR-Fragmenten, ausgeschnittenen Inserts und zur Entfernung ungeschnittener Plasmide aus Restriktionsansätzen verwendet.

### 2.18.5 Phenolchloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Extraktion mit Phenol-Chloroform-Lösung stellte eine weitere Möglichkeit dar, Proteine und andere Verunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Ein nachfolgender Fällungsschritt dient zur Entfernung des Extraktionsmittels. Die

Fällung wurde auch einzeln zur Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren eingesetzt.

Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Lösung versetzt und das Gemisch anschließend 30 s – 5 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Chloroform bildete die untere Phase, während sich die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren oben befand. An der Trennschicht/Interphase befand sich das präzipitierte Protein. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen ohne Präzipitat aufzunehmen.

Zur Fällung wurde 1/10 Volumenanteil 3M Natriumacetat/Essigsäure (pH 5.2 RT) und entweder 2 Volumen Ethanol (-20 °C) oder 0.7 Volumen Isopropanol (-20 °C) hinzugefügt. In Abhängigkeit von der gewünschten Ausbeute wurde 30-240 min bei -20 °C gefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 16000 g sedimentiert. Es schloß sich ein Waschschriff mit 70 % (v/v) Ethanol an, um Salze zu entfernen. Die Zentrifugationszeit konnte hierbei auf 5 min verringert werden.

#### 2.18.6 Ligation

In der Ligation wurde ein drei- bis zehnfacher Überschuss an Insert gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Gesamtmenge an DNA betrug 50-200 µg. Eine Abschätzung der Mengenverhältnisse auf dem Agarose-Gel war ausreichend. Ligationen von überstehenden Enden wurde für mindestens 1 h bei 22 °C durchgeführt, während glatte Enden über Nacht bei RT ligiert wurden.

Reaktionsansatz für überstehende und glatte Enden:

10x Ligasepuffer	2 µl
Vektor + Insert	x µl
T4-DNA-Ligase	4 U
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 20 µl

#### 2.18.7 Transformation

Ligationsansätze und Plasmide wurden mit der Hitzeschock-Methode in *E. coli* transformiert. Hundert Mikroliter einer kompetenten *E. coli* Suspension wurden auf Eis aufgetaut und 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. wenige ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, 75 s auf 42 °C erwärmt, erneut 2 min auf Eis gestellt und auf LB-Agarplatten mit Zusatz von Antibiotikum ausgestrichen.

### 2.18.8 Plasmid-DNA-Präparation

Präparationen von Plasmid-DNA wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Zellwand der Bakterien wurde hierbei mit SDS und NaOH zerstört und die genomische DNA mit den Zellproteinen und SDS ausgefällt.

Die Plasmid-DNA wurde mittels Fällung oder Säulenchromatographie aus dem Überstand aufgereinigt. Für die Aufreinigung von DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation) wurde das unten genannte Protokoll und für die präparative Gewinnung von DNA das Nucleobond-Kit (Macherey-Nagel) verwendet.

*E. coli* aus einer Übernachtskultur von 2 ml wurden durch Zentrifugation bei 14000 g für 30 s sedimentiert. Die Bakterien wurden in 250 µl Lösung I resuspendiert und es wurde 500 µl Lösung II hinzugegeben. Nach 3 min bei RT wurde mit Lösung III neutralisiert und Proteine sowie genomische DNA ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Lysat durch 10 min Zentrifugation bei 14000 g geklärt. Die Plasmid-DNA wurde mit 700 µl Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Es wurde 20 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch resuspendieren in 500 µl 70 % (v/v) Ethanol und Zentrifugation gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I	TE-Puffer 100 µg/ml RNase A
Lösung II	0.2 N NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung III	0.8 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure

### 2.18.9 Kolonie-PCR

Zur Bestimmung positiver Klone konnte neben der Minipräparation von DNA auch die Kolonie-PCR eingesetzt werden. Hierbei wurden Bakterien von der Kulturplatte direkt in eine PCR-Reaktion gegeben. Der Denaturierungsschritt bei 94 °C wurde auf 5 min verlängert, so daß die Plasmid-DNA aus den Bakterien freigesetzt wurde und mit geeigneten Primer-Oligonukleotiden das Vorhandensein des Inserts durch Amplifikation und anschließende Größenbestimmung auf dem Agarose-Gel nachgewiesen werden konnte. Üblicherweise wurden die PCR-Primer des Inserts verwendet. Zum Teil wurde einer der beiden Primer so gewählt, daß dieser mit dem Vektor hybridisieren konnte und das Vorhandensein des rekombinanten DNA-

Produktes direkt festgestellt werden konnte. Es wurde ein 25- $\mu$ l-PCR-Ansatz pro Kolonie verwendet und die DNA mit 30 Zyklen amplifiziert.

## 2.19 *in-vitro*-Transkription

Der Einfluß humaner Mediator-Komplexe auf die Polymerase-II-Transkriptionsrate wurde mittels *in-vitro*-Transkription beurteilt. Hierbei wird artifizielles DNA-Konstrukt bestehend aus einem Modellpromotor und einer kurzen Sequenz transkribiert und die Menge an synthetisierter RNA bestimmt. In diesem Versuchsansatz sind als Proteine nur die RNA Polymerase II und die Generellen Transkriptionsfaktoren erforderlich. Es ist daher möglich ein System mit gereinigten Komponenten zusammenzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu ein „grobes“ System verwendet. Pol II und die GTFs wurden als Bestandteile eines Kernextraktes hinzugefügt. Der Kernextrakt als komplexe Mischung löslicher Kernproteine enthält zusätzlich positive und negative Cofaktoren, Aktivatoren und Repressoren, Kinasen und Phosphatasen, DNA-bindende Proteine und Chromatin-modifizierende Aktivitäten. Der Vorteil des Kernextrakt-Systems ist die relative Ähnlichkeit zu den physiologischen Bedingungen. Mechanistische Aussagen über hinzugefügte Faktoren können aber durch die Komplexität des Systems erschwert werden.

Die verwendeten Modellgene bestanden aus einem viralen Promotor und einer zu transkribierenden Sequenz definierter Länge. Das Plasmid pMLC2AT enthielt die Adenovirus Major Late Promotor-Sequenzen einschließlich der USF-Bindungsstelle. Das Plasmid pML5xGal enthielt Adenovirus Major Late Corepromotor-Sequenzen und fünf Gal4-Bindungsstellen.

Plasmid	Länge des Transkriptes	Restriktionsschnittstelle	Aktivator-Bindungsstelle
pMLC2AT	398 bp	SmaI	USF
pML5xGal	398 bp	SmaI	Gal

Es ist für den Erfolg der *in-vitro*-Transkription notwendig, eine große Menge spezifisches Transkript zu erhalten und gleichzeitig unspezifische Produkte zu unterdrücken. Bei der Herstellung der Matrize wurde darauf geachtet, DNA mit einem sehr hohen Anteil überspiralisierter Plasmide zu erhalten, da die Polymerase II an Einzelstrangbrüchen unspezifisch die Transkription initiieren kann. Die zu

transkribierenden Sequenzen enthielten keine G-Basen im Sinnstrang, so daß die Transkription spezifisch am Ende dieser G-freien Kassette durch hinzugefügtes O-Methyl-guanosin-triphosphat (OMG) abgebrochen werden konnte. OMG ist ein G-Analogon, das nach Einbau in die RNA das Anheften weiterer Nukleotide blockiert. OMG unterdrückt daneben auch unspezifisch entstehende Transkripte, da diese nur bis zu einer geringen Länge elongiert werden.

Außerdem wurde die DNA an einer Restriktionsschnittstelle direkt am 3' Ende der G-freien Kassette geschnitten (in diesem Fall mit *SmaI*), so daß die Polymerase II sich an dieser von der Matrize ablöste.

Die Kombination beider Methoden zum Abbruch der Transkription war sinnvoll, da keine davon vollständig effektiv ist. Kernextrakte enthalten immer endogenes GTP, welches durch Kompetition mit OMG eine Transkription über die gewünschte Länge hinaus ermöglichen kann.

Für die Visualisierung der Transkriptes wurde mit  $^{32}\text{P}$  markiertes UTP verwendet. UTP dient im Gegensatz zu den anderen Nukleotiden nicht als Substrat für Kinasen und wird daher nicht von Proteinen gebunden. Die Transkripte von 398 bp Länge wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt.

Der Transkriptionsansatz wurde auf Eis gemischt und die Transkription für 60 min bei 28 °C durchgeführt. Es wurde auf eine vollständige Durchmischung geachtet und ggf. zentrifugiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.4 ml Stop-Puffer abgebrochen. Die RNA wurde durch einmalige Extraktion mit Chloroform von Protein befreit und mit 0.4 ml eiskaltem Isopropanol für mindestens 2 h bei -20 °C gefällt. Nach der Entfernung von Isopropanol und Salzen durch Waschen des Sediments mit 0.6 ml 80 % (v/v) Ethanol und kurzer Trocknung im Vakuumkonzentrator wurde die RNA in 10 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und durch fünfzehnminütige Inkubation bei 58 °C gelöst.

Das denaturierende Gel wurde durch 30 min Vorlauf bei 60 mA aufgewärmt und nach Entfernen präzipitierten Harnstoffs aus den Geltaschen der Lauf bei 50 mA für ca. 2 h durchgeführt. Danach wurde zur Fixierung der RNA und Entfernen des Harnstoffs das Gel mit 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert und kurz mit Wasser gewaschen. Die markierte RNA wurde mittels Autoradiographie oder dem Instant Imager sichtbar gemacht.

OMG-Mix	10 mM ATP 10 mM UTP 2 mM OMG 0.5 mM CTP
Transkriptionsansatz	25 mM Hepes-KOH (pH 8.2 RT) 5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM DTT 0.2 mM PMSF 1 U/μl RNAsin 100 ng Plasmid
Stopp-Puffer	7M Harnstoff 10 mM Tris-HCl (pH 7.8 RT) 10 mM EDTA/NaOH (pH 8.0 RT) 0.5 % (w/v) SDS 100 mM LiCl 0.4 mg/ml tRNA aus Hefe 300 mM Natriumacetat
Formamid-Auftragspuffer:	97% Formamid (deionisiert) 20 mM Tris-HCl (pH 7.3 RT) 10 mM EDTA/NaOH (pH 8.0 RT) 0.1 % (w/v) Bromphenolblau 0.1 % (w/v) Xylencyanol
Gellösung:	5% (w/v) (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid 1x TBE 8 M Harnstoff 0.4 ml 30 % (w/v) APS / 50 ml Gellösung 25 μl TEMED / 50 ml Gellösung

### 2.19.1 Immundepletion von Kernextrakten für die *in-vitro*-Transkription

Mittels BC2000 wurde der Kernextrakt auf eine Ionenstärke entsprechend 150 mM KCl gebracht. Zudem wurde NP-40 ad 0.05 % hinzugefügt. Die Depletion erfolgte mit 0.2 Extraktvolumina Protein-G-Sepharose mit ca. 1.5 μg/ml MED15-Antikörper bzw. Kontrollantikörper für 2 h bei 4 °C. Der Extrakt wurde in Aliquots mittels N<sub>2</sub>(l) eingefroren.

### 2.19.2 Verwendung von immobilisierten Komplexen in der *in-vitro*-Transkription

Der Mediator-Komplex konnte in immobilisierter Form in Transkriptionsreaktionen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde der Komplex an mittels Protein-G-Sepharose immobilisierten Antikörpern oder an GST-Pol-II-CTD auf Glutathion-Sepharose gebunden. Der immobilisierte Komplex wurde nach den Bedingungen der jeweiligen Affinitätsreinigung gebunden und gewaschen. Zum Aufteilen der Sepharose wurden jeweils 5 µl suspendiert in 25 µl Gesamtvolumen BC100 auf Reaktionsgefäße verteilt und nach dem Absetzen 15 µl Überstand entfernt. Sepharose und Überstand wurden dann als 10 µl BC100 in die Reaktion miteinberechnet. Der Ansatz wurde auf 30 µl erhöht. Dabei wurden die Mengen an Makromolekülen wie DNA, RNAsin und BSA gegenüber dem 20-µl-Ansatz nicht erhöht, weil sie nicht in die Sepharose diffundieren können. Die Mengen aller anderen Komponenten wurden dagegen entsprechend angepasst.

Weil sich exakt gleiche Bedingungen zu einer Transkription in ausschließlich flüssiger Phase nicht verwirklichen lassen, war die Erstellung von Kontrollen mit unbeladener Sepharose erforderlich.

## 3 Ergebnisse

Mit biochemischen Methoden und Antikörpertechniken wurde insbesondere das regulatorische Proteom des Zellkerns analysiert. Die Arbeiten waren in mehreren Stufen mit steigender Spezifität organisiert. Die Fraktionierung von Zellen macht sich ihre Kompartimentierung zunutze und stellt eine grobe Auftrennung von zellulären Proteomen dar. Sie war eine Voraussetzung für mehrere weiterführende Experimente. Motivantikörper und die Far-Western-Färbung von Kernproteinen ermöglichten die Betrachtung von Proteinsubpopulationen mit den entsprechenden Peptidmotiven. Mit spezifischen Antikörpern wurde schließlich der Mediator, seine Eigenschaften und seine Assoziation mit anderen Transkriptionskomplexen untersucht.

### 3.1 Zellfraktionierung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die bestehenden Methoden zur Zellfraktionierung zu optimieren, um auf diese Weise nachfolgende Experimente zu erleichtern, um das Proteom des Zellkerns und des Chromatins anzureichern sowie um Aussagen über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen treffen zu können.

Als Grundlage dienten Protokolle zur hypotonen Lyse von Zellen, zur Extraktion von Zellkernproteinen und zur Extraktion chromatinbindender Proteine mittels Nukleasebehandlung. Als erster Schritt in allen Protokollen führt die Inkubation der Zellen in einer hypotonen Pufferlösung zu einer Vergrößerung des Cytoplasmavolumens, welches einen mechanischen Zellaufschluß oder eine Lyse mit Detergentien vereinfacht. Zellkerne sind bei niedriger Ionenstärke stabil und können durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Extraktion der Kerne mit Hochsalzpuffer führt zu einem Ausstrom des Nukleoplasma in die Pufferlösung und gleichzeitig werden schwache ionische Wechselwirkungen von Zellkernproteinen mit Nukleinsäuren und anderen Strukturen des Zellkern aufgehoben. Bei der Extraktion chromatinbindender Proteine werden zusätzlich Nukleasen verwendet, wie z.B. DNaseI oder Micrococcus-Nuklease. Dieses Verfahren kann verwendet werden, um Gesamtheit löslicher Zellkernproteine zu erhalten, einschließlich des Nukleoplasma. In den Zellfraktionierungen dieser Arbeit wurden Zellkerne dagegen erst nach Herstellung des Kernextraktes mit Nuklease behandelt, um spezifisch chromatinbindende Proteine in einer gesonderten Fraktion anzureichern.

Die Qualität einer Zellfraktionierung lässt sich anhand der Trennschärfe, der Ausbeute und der Reproduzierbarkeit beurteilen. In Extrakten, die nach den herkömmlichen



Protokollen hergestellt wurden, lassen sich viele gemeinsam enthaltende Proteine in den Fraktionen finden. Insbesondere befindet sich in den Kernextrakten eine Vielzahl abundanter cytoplasmatischer Proteine. Die Ursache liegt in der zwangsläufig unzureichenden Abtrennung der cytoplasmatischen Fraktion bei der Gewinnung der Zellkerne durch Zentrifugation. Hierbei kann ein zusätzliches Waschen der Zellkerne in Niedrigsalzpuffer die Trennschärfe erhöhen.

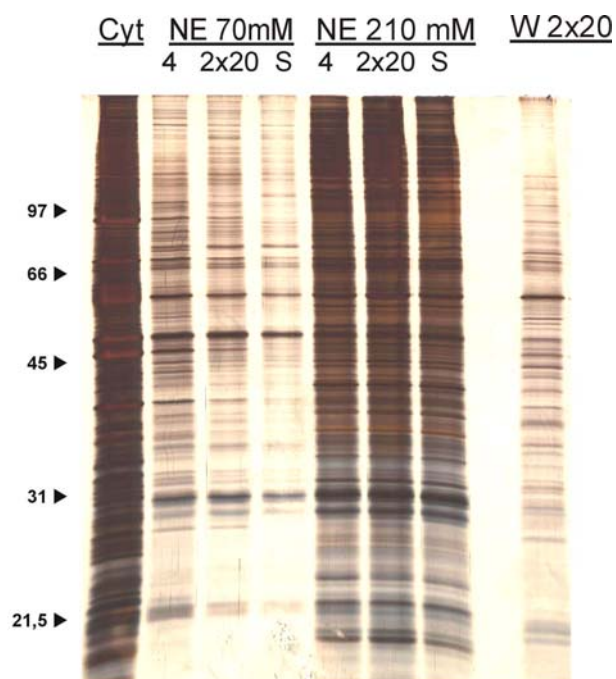
Neben anhaftender cytoplasmatischer Fraktion enthält das Zellkernsediment Zelltrümmer aus denen Proteine durch Hochsalzextraktion herausgelöst werden könnten. Es ist denkbar, daß das Waschen der Zellkerne bereits einen Teil dieser Verunreinigungen entfernt, falls diese langsamer sedimentieren als die Zellkerne.

Eine bessere Abtrennung ist durch ein Sucrose-Kissen zu erwarten. Die Zellkerne müssen dabei eine hochviskose Sucroslösung passieren, während Zelltrümmer mit ihrer geringeren Dichte und Größe zurückgehalten und u. U. von den Kernen mechanisch entfernt werden. Das Protokoll wurde mit Jurkat-Zellen und den verschiedenen Methoden zur Abtrennung cytoplasmatischer Proteine durchgeführt (Abbildung 3.1). Im Einzelnen wurden verglichen: ein theoretisch unzureichender Waschschrift von einmalig vier Kernsedimentvolumina (theoretische Verdünnung 1:4), ein doppelter Waschschrift mit jeweils 20 Kernvolumina (theoretische Verdünnung 1:400) und ein Sucrosekissen mit 1.8 M Sucrose in Niedrigsalzpuffer. Unter dem Mikroskop war zu erkennen, daß die sedimentierten Zellkerne aus dem Sucrose-Kissen einen deutlich geringeren Anteil an Zelltrümmern enthielten.

Es wurden dann zu Testzwecken zwei sequentielle Zellkernextraktionen mit 70 mM und 210 mM NaCl durchgeführt. Der Vergleich mit den zugehörigen cytoplasmatischen Fraktionen und den 210-mM-Fraktionen zeigt, daß die 70-mM-Fraktionen relativ nur eine geringe Menge Protein enthalten und die entsprechenden Banden hauptsächlich den Proteinen in der cytoplasmatischen Fraktion zuzuordnen sind. Die Intensität der cytoplasmatischen Banden nahm durch die umfangreicheren Waschschrift ab und war nach Verwendung des Sucrose-Kissens am niedrigsten. Der Proteingehalt der Hochsalzkernextrakte ist deutlich höher und ein eventuelles vorzeitiges Auswaschen von Zellkernproteinen ist nicht zu erkennen.

Die Proteine, die sich im Zellkern im Nukleoplasma oder an das Chromatin gebunden befinden, sind nicht räumlich voneinander getrennt. Es ist daher anzunehmen, daß sich die Zusammensetzung der beiden Fraktionen überschneidet. Aus diesem Grund wurden die Zellkerne zwischen der Hochsalz- und der Nukleaseextraktion nur mit

einmalig zehn Kernpelletvolumina einer Mischung aus Hoch- und Niedrigsalzpuffer gleicher Ionenstärke gewaschen.

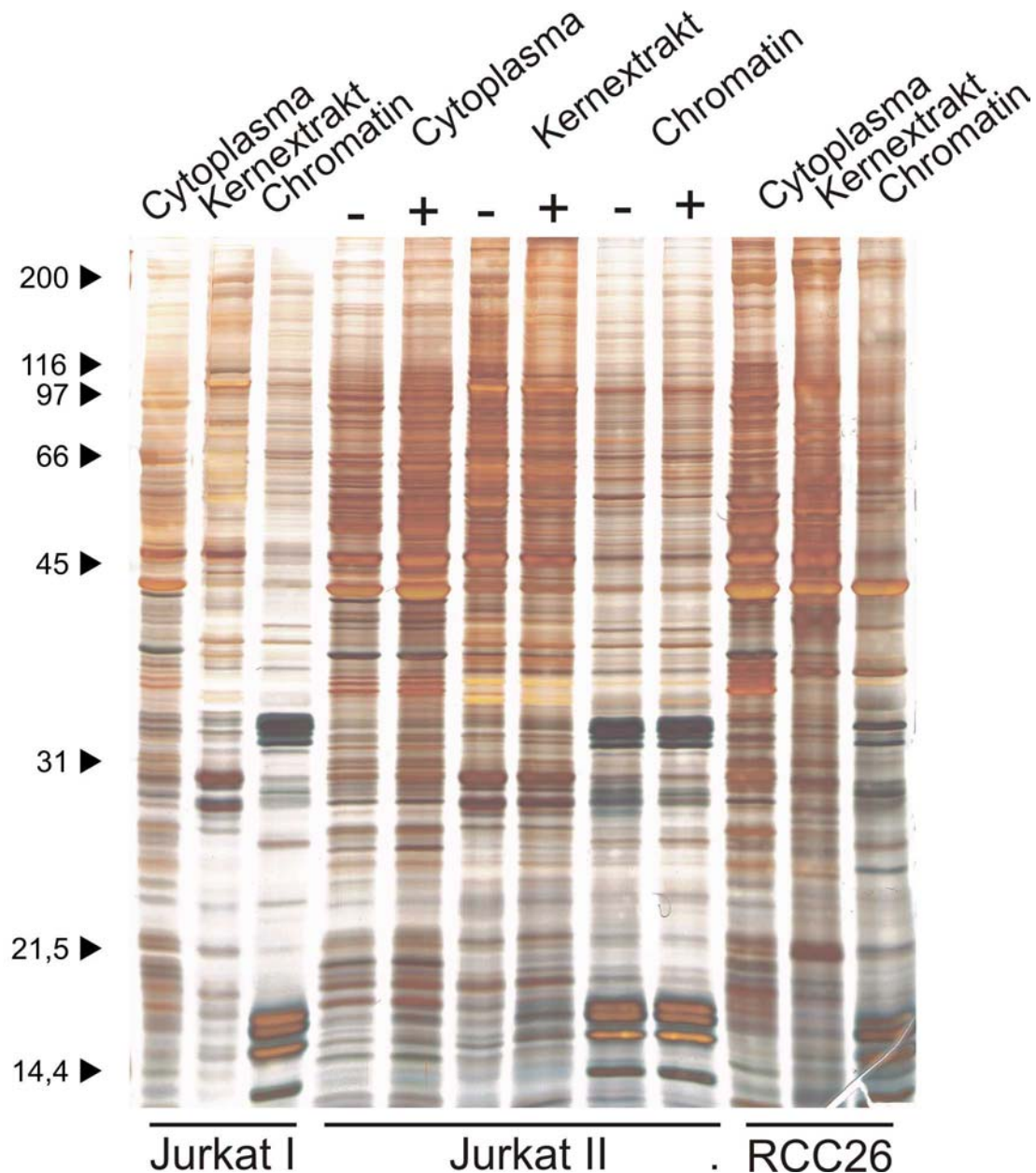


**Abbildung 3-1: Alternative Waschritte erhöhen die Trennschärfe der Zellfraktionierung.** Zellkerne wurden durch hypotone Lyse von Jurkat-Zellen hergestellt und unter verschiedenen Bedingungen gewaschen, um cytoplasmatische Proteine und Zelltrümmer zu entfernen. Die Kerne wurde entweder mit einmal vier Zellkernvolumina (4) bzw. zweimal 20 Volumina (2x20 und Überstand W 2x20) Niedrigsalzpuffer gewaschen oder durch ein Sucrose-Kissen (S) aufgereinigt. Es folgten sequentiell eine Extraktion bei 70 mM NaCl und bei 210 mM NaCl. Der Vergleich hochabundanter Proteine im Cytoplasma und im Hochsalzextrakt erlaubt die Identifikation rein cytoplasmatischer Proteine und ihre Quantifizierung im Niedrigsalzextrakt. Die mechanische Abtrennung von Zelltrümmern im Sucrose-Kissen bewirkt die deutlichste Entfernung von Nicht-Zellkernproteinen.

Das so erstellte Protokoll sollte auf Jurkat-T-Zellen und RCC26 Nierenkarzinomzellen angewandt werden. Alle Fraktionierungen führten zu einer deutlichen Trennung in die drei Fraktionen (Abbildung 3.2). Die hohe Trennschärfe ist sehr gut an einzelnen deutlichen Banden zu beobachten, die jeweils nur in einer einzigen Fraktion auftreten. Insgesamt gleichen sich die drei (an zwei verschiedenen Tagen durchgeführten) Zellfraktionierungen der Jurkat T-Lymphozyten. Die Stimulierung der T-Zellen mit PMA/PHA (s. Abschnitte 3.2 und 3.3) bewirkte nahezu keine sichtbaren Veränderungen.

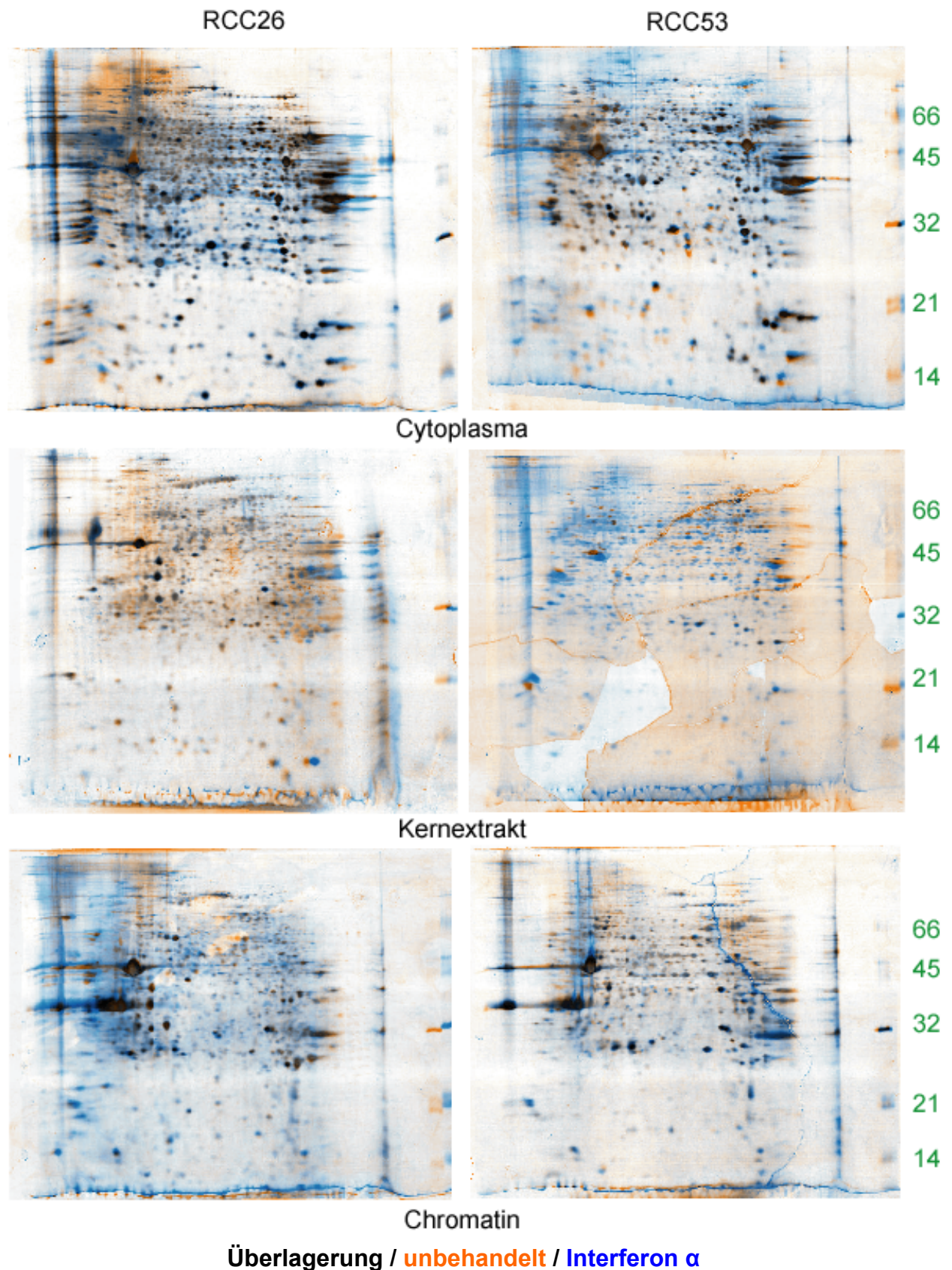
Mit den Protokollen zur Zellfraktionierung sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Interferon  $\alpha$ , eine etablierte Therapiemöglichkeit gegen Nierenkrebs (Neidhart 1986), Auswirkungen auf das Proteom von RCC26 und RCC53-Nierenkrebszellen hat. Aufgrund limitierter Zellzahlen wurde hier auf das Waschprotokoll mit 2 x 20 Kernpelletvolumina Puffer zurückgegriffen.

Am auffälligsten sind die Übereinstimmungen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sowie die deutliche Trennung der Fraktionen in beiden Zelllinien (Abbildung 3-3). Hauptsächlich in den Chromatinfractionen finden sich differentielle Spots, die sich zum Teil aber nicht vollständig auf unterschiedliche Überschneidung mit dem Kernextraktproteom zurückführen lassen.



**Abbildung 3-2: Adhärenente Zellen und Suspensionszellen können reproduzierbar fraktioniert werden.** Es wurden Jurkat-Zellen als Suspensionszellen und RCC26-Nierenkrebszellen als adhärenente Zellen fraktioniert. Die Fraktionierung der Jurkat-Zellen erfolgte an zwei verschiedenen Tagen („Jurkat I und II“). Zudem wurden Jurkat-Zellen mit PMA/PHA stimuliert und mit unstimulierten Zellen verglichen. Das Fraktionierungsprotokoll führt bei beiden Zelltypen zu einer Auftrennung in distinkte Fraktionen. Die parallel durchgeführte Herstellung der „Jurkat-II-Extrakte“ führt trotz der Stimulierung zu einem nahezu identischen Bandenmuster.





**Abbildung 3-3: Fraktionierung von Nierenkrebszellen RCC26 und RCC53.** Mit Interferon  $\alpha$  behandelte und unbehandelte RCC26 und RCC53-Zellen wurden fraktioniert und jeweils 300  $\mu$ g Gesamtprotein in der 2D-PAGE aufgetrennt. Die Unterschiede zwischen den Fraktionen sind sehr deutlich, während sowohl die beiden Zelllinien als auch die Extrakte aus behandelten wie unbehandelten Zellen große Übereinstimmungen aufweisen (schwarze Spots).

### 3.2 Motivspezifische Antikörper

Ein beachtlicher Teil der Funktionsvielfalt eukaryotischer Proteome beruht auf der Kombination verschiedener Module bzw. Domänen in den einzelnen Proteinen. Häufig erlaubt bereits ein Vergleich der Primärstrukturen *in silico* die Einteilung in funktionale oder evolutionäre Proteinfamilien. Im Folgenden sollen diese Erkenntnisse mit Hilfe motivspezifischer Antikörper experimentell nutzbar gemacht werden.

Motivantikörper sind Antikörper, die statt eines einzelnen Proteins eine größere Anzahl ähnlicher Proteine erkennen – im Idealfall ein ganzes Subproteom, das durch spezifische Funktionen, Strukturen oder posttranslationale Modifikationen gekennzeichnet ist.

Antikörper besitzen die Fähigkeit, starke Protein-Protein-Wechselwirkungen über eine nur geringe Zahl von Kontakten zwischen Aminosäuren auszubilden. Dabei können sie kurze Sequenzen (kontinuierliche Epitope) und in der Tertiärstruktur benachbarte Aminosäuren binden (diskontinuierliche Epitope). Ist dasselbe Epitop in mehreren Proteinen vorhanden und zugänglich, werden diese Proteine als Gruppe erkannt und gebunden.

Die hohe potentielle Spezifität erlaubt es, Antikörper gegen eine einzige posttranslationale Modifikation in einer spezifischen Sequenz zu generieren. Bei der Herstellung von Motivantikörpern ist es dagegen eine Toleranz gegenüber Aminosäureaustauschen wünschenswert, denn häufig ist nur ein Teil der Aminosäuren konservierter Domänen exakt identisch.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Motive und Domänen zur Herstellung von Motivantikörpern ausgewählt. Kurze Sequenzabschnitte wurden als kontinuierliche Epitope zur Immunisierung eingesetzt. Ein Teil der Peptide wurde als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und ein Teil chemisch synthetisiert und über Carbodiimid (EDC) an das Trägerprotein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt. Peptidsynthesen und Kopplungen wurden von der AG Arnold, LMU München und AG Kremmer, GSF München durchgeführt. Die AG Kremmer übernahm auch Immunisierungen und erste Untersuchungen der Antikörperklone auf Spezifität gegen das Immunogen.

Anschließend wurde überprüft, ob die Antikörperklone den Erwartungen entsprechend eine Vielzahl von Proteinen in Jurkat-Zellfraktionen erkennen. Schließlich wurden Versuche mit Peptidarrays unternommen, um das Epitop der Antikörper zu bestimmen. Insgesamt wurden mehr als fünfzehn verschiedene Immunisierungen durchgeführt.

Beschreibung	Elemente (aus Protein)	Prototyp	Träger
Poly-(Glu/Asp)	Synthetisches Peptid		KLH
Polyprolin	Synthetisches Peptid		KLH
Polyserin	Synthetisches Peptid		KLH
MED25 – serinreiche Region	MED25		KLH
Phosphoserin	Einzelmoleküle		KLH
Phosphothreonin	Einzelmoleküle		KLH
Histon H3 hyperacetyliert	H3 6-25 K14, K18, K23 Ac		KLH
PKC Phosphoryl.-Stelle	6 typische Konsensus-Sequenzen	<b>TTK, TAR</b>	KLH
CKII Phosphoryl.-Stelle	18 Peptide – Konsensus: SXXE	SXXE	KLH
ATP-bindende Domäne verschiedener Helikasen	CHD1(h), Pre-mRNA splicing factor Helicase	<b>DEMGKGKT</b>	KLH
	eIF4A, Ku86, WRN	<b>GATGCGKT</b>	GST
ATP-bindende Domäne verschiedener Kinasen	c-abl, p70S6K	<b>LGGGQYGEVY</b>	KLH
	CDK7, CDK9, PKR	<b>LGEQG FATV</b>	GST
Kernexportsignal	SMAD4, APC, RanGAP	<b>GIDLSGLTLQ</b>	GST
Kernlokalisationssignal	NC2β, MLL, SV40	<b>PKKKRKV</b>	GST
MLL SNL-2	10 konservierte Aa. aus MLL	<b>GPRIKHVCRC</b>	KLH
MLL SET-Domäne	Zwei Abschnitte aus MLL		KLH

**Tabelle 3.1: Immunogene zur Herstellung der Motivantikörper**

Die Immunogene beinhalteten Polyamino-säure-Motive, die häufig in Proteinen vorkommen, modifizierte Aminosäuren, Consensussequenzen für Kinasen und hochkonservierte Sequenzen mit bekannten Funktionen (Tabelle 3-1). Beispielsweise besteht die ATP-bindende Domäne der Kinasen aus einer Reihe von konservierten Glycin-Resten und weiteren schwächer konservierten Aminosäuren.

Insgesamt wurden nur aus drei Immunisierungen Antikörper-Klone erhalten, die die Fähigkeit zur Bindung mehrerer Proteine besitzen. Im Einzelnen waren diese gegen Polyprolin, Poly-(D/E) und gegen das ATP-bindende Motiv der Kinasen gerichtet.

### 3.2.1 Polyprolin-Motivantikörper

Die höchste Anzahl positiver Klone wurde durch Immunisierung mit Polyprolin erhalten. Dieses Motiv gehört zu den häufigsten Peptidmotiven im Proteom und ist an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt. Unter anderem SH3-, WW- und EVH1-Domänen binden Polyprolin oder prolinreiche Liganden (Übersicht in Zarrinpar et al. 2003). Die Bindung erfordert dabei eine besondere Sekundärstruktur: die sogenannte Polyprolin Typ II Helix.

Polyprolin-Proteine, die in der Transkription eine Rolle spielen, sind z.B. die Histonmethyltransferasen Dot1 und hSET1 (KIAA0339 und Paralog KIAA1076), die Histonacetyltransferase MYST4, eine Untereinheit des Spleißfaktors 3B und die Transkriptionsfaktoren Hox-B4 und Sp5 (s. Anhang).

Zur Überprüfung der Klone wurde Polyprolin auf eine Membran gegeben und die Hybridomüberstände im Dot Blot getestet. Vier aus über 30 Klonen produzierten ein besonders deutliches Signal. Weitere Untersuchungen an zellulären Extrakten im Western Blot ergaben, daß der Klon 9A9, ein IgM-Antikörper, die größte Anzahl von Proteinen erkennt und ein weiterer Klon - 9E11 (ein IgG) - nahezu vergleichbare Ergebnisse erreichte. IgM-Antikörper lassen sich im Gegensatz zu IgG nur indirekt an Protein G koppeln, so daß beide Klone und zwei weitere IgG-Klone (7G8, 2C2) rekloniert wurden, um neben der Immundetektion auf Western-Blot-Membranen auch eine Immunaффinitätschromatographie durchführen zu können. Das Epitop der Klone 9A9 und 9E11 wurde auf Peptidarrays ermittelt (Abbildung 3.4). Aussagekräftig sind insbesondere die Versuche mit ununterbrochenen Prolin-Sequenzen eingebunden in eine Sequenz mit anderen Aminosäuren. Dabei bindet der Klon 9A9 Sequenzen mit mindestens 6-9 Prolinen und der 9E11 Antikörper Sequenzen mit mindestens 9-12 Prolin-Resten (Abbildung 3-4).

Die Experimente schließen nicht aus, daß unterbrochene Polyprolin-Sequenzen ebenfalls gebunden werden können, doch ist bei der Peptidsynthese auf der Membrane eine hohe Fehlerrate und damit ein Anteil fehlerhaft verbundener Polyprolinabschnitte zu erwarten.

### 3.2.2 Poly-(D/E)-Motivantikörper

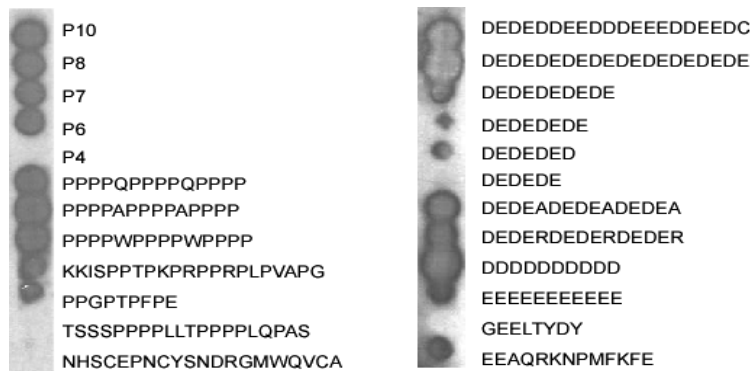
In vielen funktional unterschiedlichen Proteinen treten negativ geladene Motive auf, die z.T. ausschließlich aus Glutamin- und Asparaginsäure bestehen. Zahlreiche dieser Proteine sind mit dem Chromatin bzw. der Transkriptionsmaschine assoziiert. So z.B. die Histonacetyltransferase MORF, das das *chromatin-remodeling*-Protein dek, die SAP180-Untereinheit aus dem Sin3A-Histondeacetylase-Komplex, der chromatinassoziierte Regulator ATRX, die Histonmethyltransferase G9A, der TAF7-Paralog TAF7L und der PPAR-gamma-Coaktivator PGC-1, der mit dem Mediator-Komplex interagiert. In den abundanten Nichthiston-Chromatinproteinen HMG1/HMG2 (*high mobility group*) wurden Effekte dieses Motivs auf die Stabilität des Proteins und eine Modulation der DNA-Bindung dieser Proteine beschrieben (Knapp et al. 2004, Thomas 2001). Im Falle von HMGB1 wurde eine Interaktion eines einfachen negativ geladenen Motivs (DDDDE) mit dem positiv geladenen N-terminus von Histon H3 demonstriert (Ueda et al. 2004), was suggeriert, daß sich bei vielen dieser Motive um chromatinbindende Domänen handeln könnte.

Die Immunisierung mit einem Zufallspeptid aus Glutamat- und Aspartat-Resten brachte einen Klon – 2G6 – hervor, der die Anforderungen an einen Motivantikörper erfüllte, indem er zahlreiche zelluläre Proteine auf Western-Blot-Membranen band. Die Epitopbestimmung ergab, daß die Bindung saurer/negativ geladener Motive durch den Antikörper 2G6 unabhängig von der Abfolge der entsprechenden Aminosäuren ist, der Antikörper aber eine Präferenz für Aspartat-Reste hat (Abbildung 3.4). Für eine effiziente Bindung scheint ein Motiv von 10-15 Aminosäuren ausreichend zu sein, das von einzelnen neutralen Aminosäuren unterbrochen sein kann.

### 3.2.3 Antikörper gegen das ATP-bindende Motiv von Kinasen

Gegen das Kinase-Motiv wurde ein Antikörper-Klon -LGG 9C2- erhalten, der auf den Peptidarrays vor allen Dingen die zusammengesetzte Sequenz des Immunogens band und nur sehr schwach das ATP-bindende Motiv aus c-Abl detektieren konnte. Dennoch bindet der Antikörper eine Reihe von Proteinen in zellulären Extrakten (Abbildung 3-7), u.a. hnRNP A1, das mehrere glycinreiche Regionen enthält.





**Abbildung 3-4: Epitop-Bestimmung der Polyprolin- und Poly-(D/E)-Antikörper mittels Peptidarray.**

Der Polyprolin-Antikörper 9A9 bindet Sequenzen ab sechs Prolin-Resten (P6-10) und z.T. unterbrochene prolinreiche Sequenzen (links). Der Poly-(D/E)-Antikörper 2G6 bindet neben seinem Immunogen (oben rechts) auch beliebige andere saure Peptidsequenzen, wenn diese eine bestimmte Länge erreichen. Offenbar sind zehn saure Reste nicht ausreichend für ein vergleichbares Signal. Eine Unterbrechung der Sequenz durch Alanin stört die Detektion nicht, im Gegensatz zur basischen Aminosäure Arginin, die die Signalstärke herabsetzt. Der Antikörper zeigt eine Präferenz für Poly-Asparaginsäure (D) gegenüber Poly-Glutaminsäure (E).

### 3.2.4 Differentielle Expression von Polyprolin und Poly-(D/E)-Proteinen in der T-Zell-Aktivierung

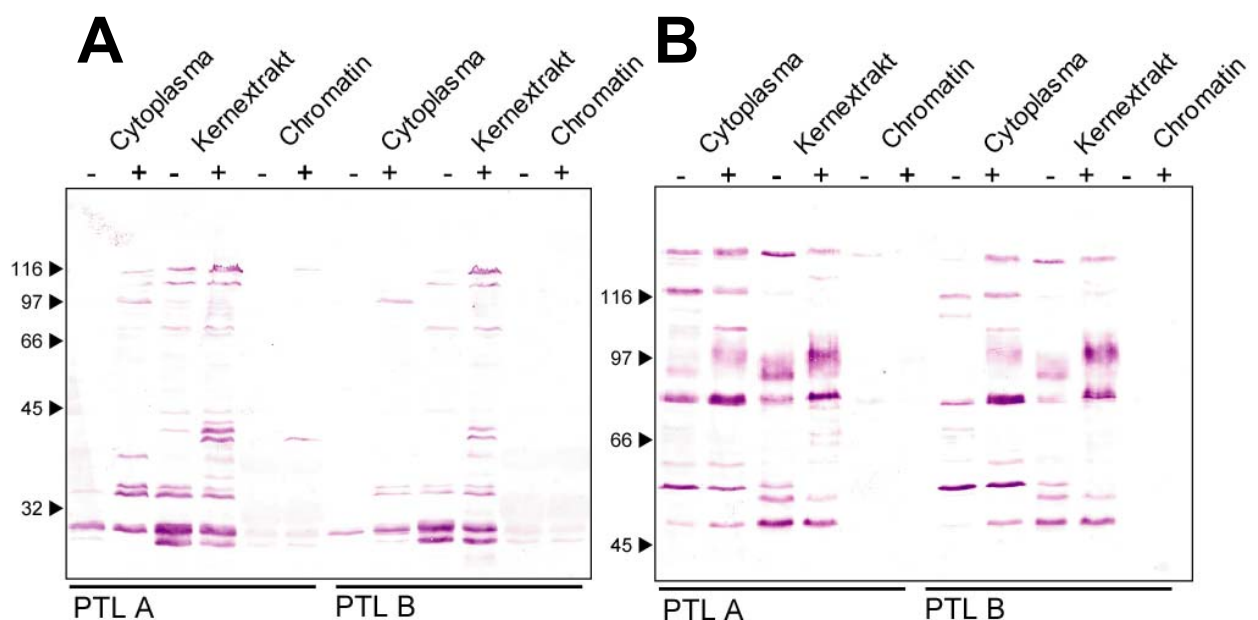
Das Potential der Motivantikörper, differentiell exprimierte Proteine mit den bestimmten funktionalen Elementen nachzuweisen, sollte insbesondere auf den biologisch interessanten Prozeß der T-Zell-Aktivierung angewandt werden.

Um auf eine Vielzahl unbekannter Krankheitserreger reagieren zu können, befindet sich beispielweise im menschlichen Körper eine große Zahl unterschiedlicher T-Zell-Klone, die sich in einem ruhenden Stadium befinden bis sie spezifisch aktiviert werden. Bevor ein T-Lymphozyt seine Funktion als T-Helferzelle oder als cytotoxische T-Zelle ausüben kann, ist es erforderlich, daß er ein entsprechendes, zu seinem T-Zell-Rezeptor passendes Antigen präsentiert bekommt.

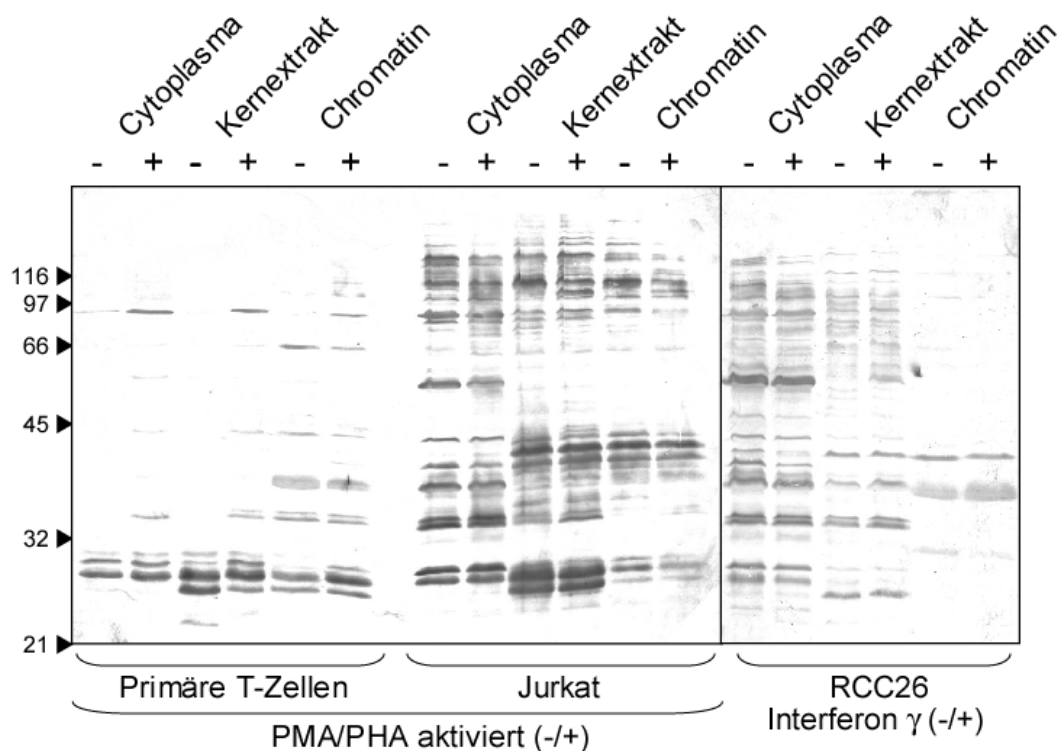
Dieses Signal, das von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) ausgeht, bewirkt eine Proliferation und die Differenzierung in die Effektorzellen. Der Prozeß der T-Zell-Aktivierung beruht auf einer komplexen Signalkaskade, die sich ausgehend vom T-Zellrezeptor bis in den Zellkern erstreckt. Daraus resultiert eine umfangreiche Stimulierung und Modulierung der Proteinsynthese: das Chromatin wird z.T. dekodensiert, die mRNA Transkriptionsrate steigt an und die Synthese ribosomaler RNA nimmt ebenfalls zu. Neben der globalen Stimulation der Transkription ist eine deutliche Veränderung des Spektrums transkribierter Gene zu erkennen (Teague et al. 1999).

Um im Experiment die T-Zell-Aktivierung in einer großen Zahl von Zellen zu simulieren, muss sie unspezifisch erfolgen. Dies wird zum einen durch Zugabe des Lektins Phytohemagglutinin (PHA) erreicht, welches die Rezeptoren einschließlich des TCR miteinander vernetzt. Zusätzlich kann der Proteinkinase C (PKC) Signalweg durch den Phorbolester PMA stimuliert und damit auf eine bedeutende Komponente der Signalkaskade eingewirkt werden.

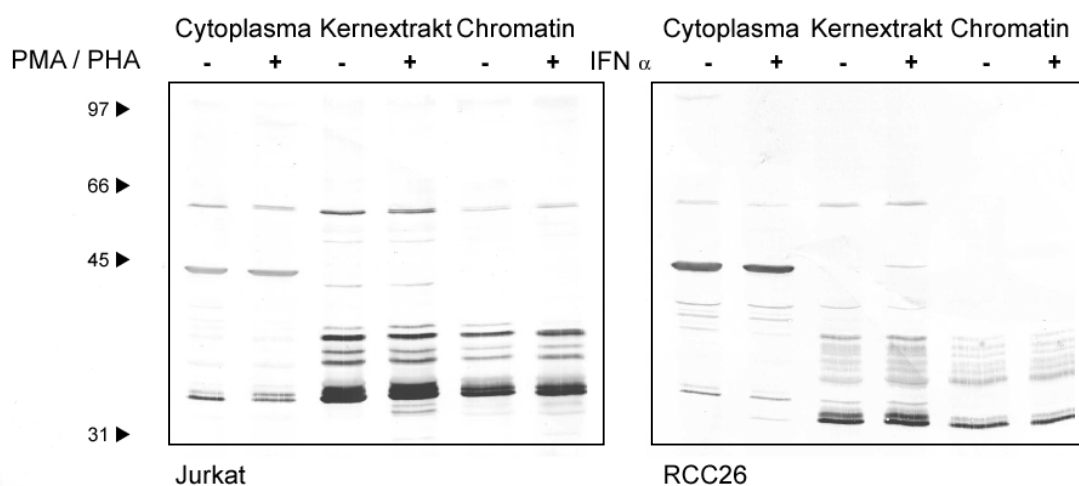
Untersuchungen in der Jurkat T-Zelllinie zeigten nur geringe signalabhängige Veränderungen in der Proteinexpression, offenbar weil diese Zellen bereits ohne Einfluß von außen proliferieren. Daher wurden naive T-Zellen aus menschlichem Blut isoliert und gleichfalls untersucht. Auch sollte als weiteres Modellsystem die Behandlung von Nierenkrebszellen (RCC26) mit Interferon gamma betrachtet werden. Die Ergebnisse für die Polyprolin und Poly-(D/E)-Antikörper sind vergleichbar. Die Stimulierung naiver T-Zellen bewirkt die differentielle Expression mehrerer Proteine (Abbildung 3-5). In beiden Zelllinien, Jurkat und RCC26, ist die Zahl der detektierbaren Proteine mit Poly-(D/E)-Motiv um ein Vielfaches höher (Abbildung 3-6). Interessanterweise gibt es viele Gemeinsamkeiten zwischen den transformierten Zellen, die offenbar unabhängig von den völlig unterschiedlichen Gewebetypen und der Morphologie der Zellen sind.



**Abbildung 3-5: Differenziell exprimierte Poly-Prolin-Proteine (A) und Poly-(D/E)-Proteine (B) in primären T-Lymphocyten.** PTL aus zweimal je zwei Patienten (PTL A / PTL B) wurden kultiviert und die Hälfte aus jeder Probe mit PMA/PHA stimuliert. Nach 24 h wurden Zellfraktionierungen parallel durchgeführt und Polyprolin-Proteine mit dem 9A9-Antikörper und Poly-(D/E)-Proteine mit dem 2G6-Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht. Mehrere Proteine sind reproduzierbar als differentiell exprimiert zu erkennen.



**Abbildung 3-6: Die Expression von Proteinen mit sauren Sequenzbereichen ist in Krebszelllinien im Vergleich zu primären Zellen hochreguliert.** Extrakte aus PTL, Jurkat und RCC26-Zellen wurden im Western Blot auf Poly-(D/E)-Proteine untersucht. Die Zahl der erkannten Proteine ist in beiden Krebszelllinien deutlich höher als in PTL. Das Bandenmuster der PTL unterscheidet sich etwas von dem in Abbildung 3-5, weil hier nur eine kleine Menge Zellen zur Fraktionierung zur Verfügung stand.



**Abbildung 3-7: Durch den LGG 9C2-Antikörper (Kinase ATP-bindende Region) erkannte Proteine in Jurkat- und RCC26-Zellen.** Ein Protein von ca. 60 kDa wird offenbar im Verlauf der T-Zell-Aktivierung modifiziert. Während in unstimulierten T-Zellen die untere Bande innerhalb der Doppelbande dominiert, ist das Verhältnis in stimulierten Zellen paritätisch.

### 3.2.5 Aufreinigung von Proteinen mit Hilfe von Motivantikörpern

Poly-(D/E)- und Polyprolin-Antikörper sowie der Antikörper gegen das ATP-bindende Motiv der Kinasen wurden in der Immunaффinitätschromatographie getestet, um eine Vielzahl von Proteinen mit den entsprechenden Motiven isolieren zu können. Alle Polyprolin-Antikörper konnten jeweils mehrere Proteine in Extrakten binden, die wiederum auf Western-Blot-Membranen mit den jeweiligen Antikörpern nachweisbar waren. Aus Hela-Kernextrakt konnten mit dem 9E11-Antikörper fünf Proteine gereinigt werden, deren Menge für eine Färbung mit Coomassie R250 und ein massenspektrometrische Bestimmung ausreichend war (Tabelle 3-2). Diese Proteine erfüllen oder übererfüllen die Anforderungen an das Epitop des Antikörpers. Sie enthalten ununterbrochene Polyprolin-Sequenzen von 9-14 Resten und darüber hinaus jeweils mehrere unterbrochene prolinreiche Abschnitte. Bemerkenswerterweise enthalten drei dieser Proteine WW- oder EVH1-Domänen, die wiederum prolinreiche Sequenzen binden können.

Der LGG 9C2-Antikörper (Kinase-ATP-bindendes Motiv) band das Protein hnRNP A1 in cytoplasmatischen Extrakten. Dieses enthält ein glycinreiches Motiv, ist aber keine Kinase. Der Poly-(D/E)-Antikörper 2G6 eignete sich dagegen nicht für die Immunpräzipitation.

Protein	Uniprot	#	Mw. exp.	Mw. th.	Prolin	Domänen
Formin binding protein 4	Q8N3X1	226	210	110	P14	2 x WW - binden prolinreiche Sequenzen
Diaphanous-related formin 1	O60610	202	140	139	P13	Autoregulatorische Domäne Formin homology 1 Ligand für WW-Domäne Formin homology 2 bindet Aktin Formin homology 3 GTPase bindende Domäne
Splicing factor 1	Q15637	58 201	110 85	68	P12	KH1RNA-bindende Reg. CCHC Zinkfinger
MENA (Enabled homolog)	Q8N8S7	70	100	64	P9	Ran bindend EVH1 bindet FPPPPP..
WASL	Q7Z746	99	75	55	P11	GTPase bindend EVH1 - bindet FPPPPP.. WH2 - bindet Aktin

**Tabelle 3-2: Mit anti-Polyprolin 9E11 aufgereinigte Proteine.** Neben Informationen über die Domänenstruktur, das experimentelle und das theoretische (Mw. th.) Molekulargewicht ist die Länge der größten ununterbrochenen Polyprolinsequenz genannt. Alle aufgelisteten Proteine enthalten darüber hinaus weitere Polyprolin-Sequenzen. Die Genauigkeit der massenspektrometrischen Bestimmung ist als Mascot-Score (#) angegeben.

### 3.3 Detektion und Aufreinigung von Zellkernproteinen mittels Importin $\alpha$

Der Endpunkt vieler Signalwege ist die Regulation der transkriptionellen Aktivität im Zellkern. Jeweils mindestens eines der beteiligten Proteine ist dabei zeitweilig im Cytoplasma lokalisiert, um ein Signal aufzunehmen und es in den Zellkern weiterleiten zu können. Ein bedeutender Schritt eines Signalweges ist daher der regulierte Kernimport/-export.

Daneben können auch konstitutive Kernproteine bedeutsame Bestandteile von Signalwegen, der Organisation des Zellkerns oder der transkriptionellen Maschine sein und sind daher ebenfalls von großem Interesse. Insbesondere regulatorische Proteine, die eine sehr spezifische Funktion erfüllen, sind gegenüber zellulärem Gesamtprotein deutlich unterrepräsentiert. Um diese und andere Kernproteine gezielt untersuchen zu können, sollte nach dem Prinzip der Motivantikörper ein Werkzeug zur Reinigung und Detektion von Kernproteinen entwickelt werden. Die hohe Diversität von Kernlokalisationssequenzen macht es dabei unmöglich, einen multispezifischen Antikörper zu generieren. Obwohl NLS sich durch eine Häufung basischer Aminosäuren auszeichnen sind selbst komplexe Algorithmen zur Vorhersage von NLS mit Ungenauigkeiten behaftet (Cokol et al. 2000). Die Unterscheidung zwischen funktionalen NLS und basischen NLS-ähnlichen Sequenzen ist gegenwärtig weder in silico noch mit Hilfe von Antikörpern möglich. Es sollte daher ein synthetischer „Motivantikörper“ auf Basis des Kernimportrezeptors entwickelt werden.

In Western-Blot-Protokollen kann statt des primären Antikörpers auch eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne als Sonde verwendet werden (Far-Western-Blot). Importin  $\alpha$  eignet sich für diesen Verwendungszweck besser als viele andere Proteine, weil es seine Liganden (NLS) mit hohen Affinitäten, vergleichbar einer Antikörper-Antigen-Interaktion, binden kann.

Importin  $\alpha$  besteht u.a. aus zehn strukturell ähnlichen Domänen, sogenannten Armadillo-Repeats. Die zweiteilige NLS-bindende Region ist in den Domänen 3-4 und 7-8 lokalisiert. Dabei bildet die N-terminale Hauptbindestelle (*major*) die wichtigsten Kontakte zu ein- und zweiteiligen NLS aus, während die zweite Bindestelle offenbar nur wenige Aminosäurereste innerhalb zweiteiliger NLS bindet. Diese Interaktionen beruhen auf hydrophoben Wechselwirkungen konservierter Tryptophan- und Asparagin-Reste in den Arm-Repeats mit den basischen, positiv geladenen Resten innerhalb der NLS. Die NLS-Bindestelle ist im monomeren Wildtyp-Protein durch die NLS-ähnliche autoinhibitorische Domäne (IBB) blockiert und wird durch Heterodimerisierung mit Importin  $\beta$  offengelegt.

Desweiteren wurden Kontakte der C-terminalen Region außerhalb der Armadillo-Repeats zu Proteinen mit nicht-klassischen NLS beschrieben. Diese Proteine werden im Kern nicht durch die Konkurrenz mit der IBB freigesetzt, sondern durch andere Mechanismen wie beispielsweise die Überlappung der NLS mit einer DNA-bindenden Region.

Insgesamt existieren sechs Importin- $\alpha$ -Isoformen mit identischem Mechanismus und überlappendem Spektrum. Die Versuche wurden daher auf eine ubiquitär exprimierte Isoform -Importin- $\alpha$ -1- beschränkt. Für die Detektion von Proteinen mit klassischer NLS war es erforderlich, den N-terminus einschließlich der IBB zu deletieren. Um die Reinigung und Detektion zu erleichtern, wurde die Deletionsmutante als N-terminales GST-Fusionsprotein exprimiert (Abbildung 3-8 A). Neben diesem Fusionsprotein GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N wurde für Kontrollzwecke ein weiteres mit einer zusätzlichen Deletion der ersten vier Arm-Repeats einschließlich der Hauptbindungsstelle hergestellt (GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N Arm 5-10).

### 3.3.1 Spezifische Detektion von Kernproteinen im Far-Western-Blot

Far-Western-Blot-Protokolle sind im Vergleich zur üblichen Immundetektion auf Western-Blot-Membranen häufig deutlich komplizierter. Dagegen wurde angenommen, daß beim Far-Western-Blot mit Importin  $\alpha$  auf einige Zusatzschritte verzichtet werden kann. So sind NLS kurze Sequenzabschnitte, die keine eigene Tertiärstruktur ausbilden können. Daher wurde auf die Denaturierung/Renaturierung der membrangebundenen Proteine verzichtet.

Die Affinität zu NLS ist mit einer Antikörper-Antigen-Bindung vergleichbar, so daß Standardmethoden zur Immundetektion verwendet werden konnten und keine sensitiveren Methoden wie eine radioaktive Markierung des Fusionsproteins angewandt werden mußten. Das Fusionsprotein wurde analog einem Antikörper in vergleichbarer Verdünnung eingesetzt. Es wurde anschließend in einem Standardprotokoll für die Immundetektion von GST-Fusionsproteinen mittels Primär- und Sekundärantikörper auf der Membran nachgewiesen. Auf zelluläre Fraktionen aus Jurkat-Zellen angewandt ergibt sich jeweils ein komplexes Bandenmuster (Abbildung 3.8 B), während GST als Negativkontrolle keines der Proteine bindet. Importin  $\alpha$  bindet auch Proteine in einem cytoplasmatischen Extrakt.

In mehreren Experimenten fiel die erhebliche Hintergrundfärbung der Membran auf, die durch eine Reihe von Maßnahmen begrenzt werden mußte. Importin  $\alpha$  enthält mehrere Cystein-Reste, so daß es potentiell über Disulfidbrücken an

membrangebundene Proteine und an das Blockierungsreagenz binden kann. Daher wurde in weiterführenden Experimenten ein polymerbasiertes Blockierungsreagenz (Roti-Block) verwendet und dem hochverdünnten Fusionsprotein das Reduktionsmittel DTT und Milchprotein zur Stabilisierung hinzugefügt.

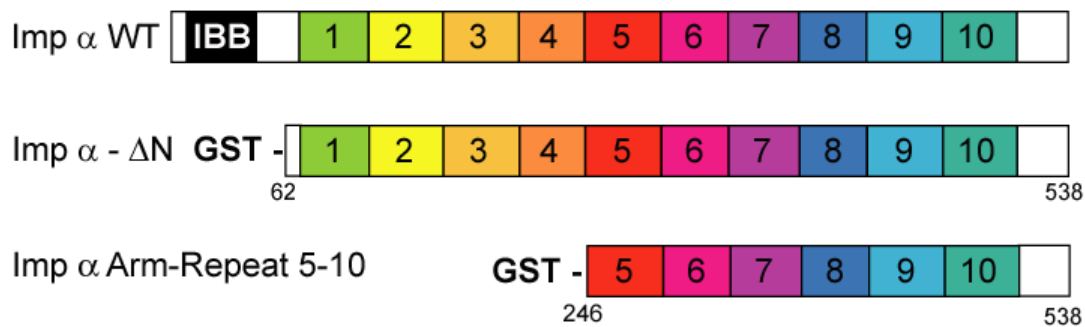
NLS werden trotz ihrer stark positiven Ladung im Wesentlichen über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Daher konnte die Ionenstärke im ersten Inkubationsschritt und dem folgenden Waschschrift auf das Niveau von 500 mM NaCl angehoben werden, ohne daß das Muster der detektierten Proteine beeinflusst wurde. Der Hintergrund wurde erheblich reduziert, so daß eine kolorimetrische Detektion von bis zu 30 min gegenüber 3-10 min im vorherigen Protokoll möglich wurde.

Da eine Identifizierung der detektierten Proteine als NLS-/Kernproteine nicht direkt möglich war, wurden alternative Methoden zur Spezifitätskontrolle entwickelt. Zwei Kontrollen bezogen sich auf die Hauptbindungsstelle für NLS im Importin  $\alpha$ . Diese Stelle kann theoretisch durch ein SV40-NLS-Peptid blockiert werden. Eine Deletion der Bindungsstelle sollte einen vergleichbaren Effekt zur Folge haben. Tatsächlich resultieren beide Methoden in einem zueinander ähnlichen Muster, welches nur noch aus wenigen Banden besteht.

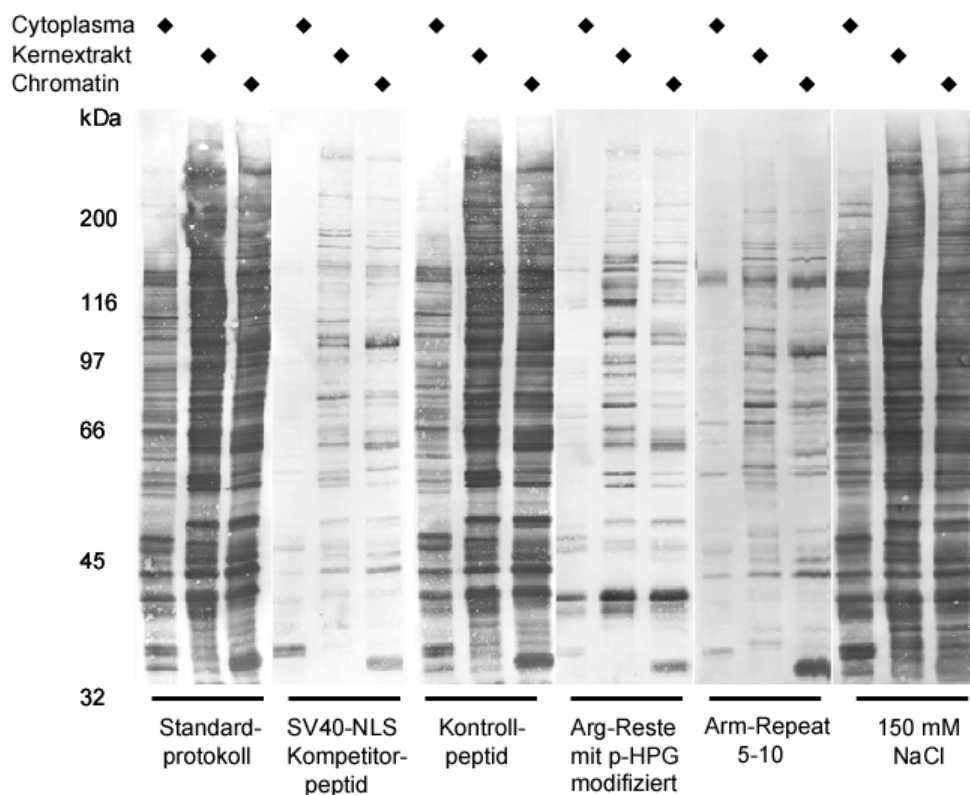
Ein weiterer Spezifitätstest bezog sich auf die auf die membrangebundenen NLS-Sequenzen. Eine chemische Modifikation der Lysin- bzw. Arginin-Reste sollte die Bindung des Fusionsproteins an entsprechend aufgebaute NLS unterbinden. Die Membranen wurden nach dem Transfer in Lösungen von Maleinsäureanhydrid zur Modifikation von Lysin-Resten bzw. in p-Hydroxyphenylglyoxal zur Modifikation von Arginin-Resten inkubiert. Beide Modifikationen resultierten jeweils in einer erhebliche Abnahme in der Zahl der detektierbaren Proteine.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob Importin  $\alpha$  hauptsächlich die Proteine des Zellkerns bindet. Hierzu wurde das Fusionsprotein als synthetischer Antikörper in der Immunfluoreszenz eingesetzt, um NLS-Proteine in Jurkat-Zellen zu detektieren. Die Zellkerne werden im Gegensatz zu ihrer Peripherie deutlich angefärbt (Anhang).

A



B



**Abbildung 3-8:** (A) Schematischer Aufbau des Importin  $\alpha$  und der Deletionsmutanten. Importin  $\alpha$  besteht aus einer N-terminalen autoinhibitorischen Domäne (IBB) und zehn Armadillo-Repeats. Importin  $\alpha$  beinhaltet zwei Bindungsstellen für NLS an Armadillo-Repeats 3-4 und 7-8, wovon die N-terminale Bindungsstelle die bedeutendsten Kontakte zu monopartiten NLS herstellt. In GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N ist die IBB und in GST-Importin- $\alpha$ -Arm-Repeat 5-10 zusätzlich die Hauptbindungsstelle für NLS deletiert.

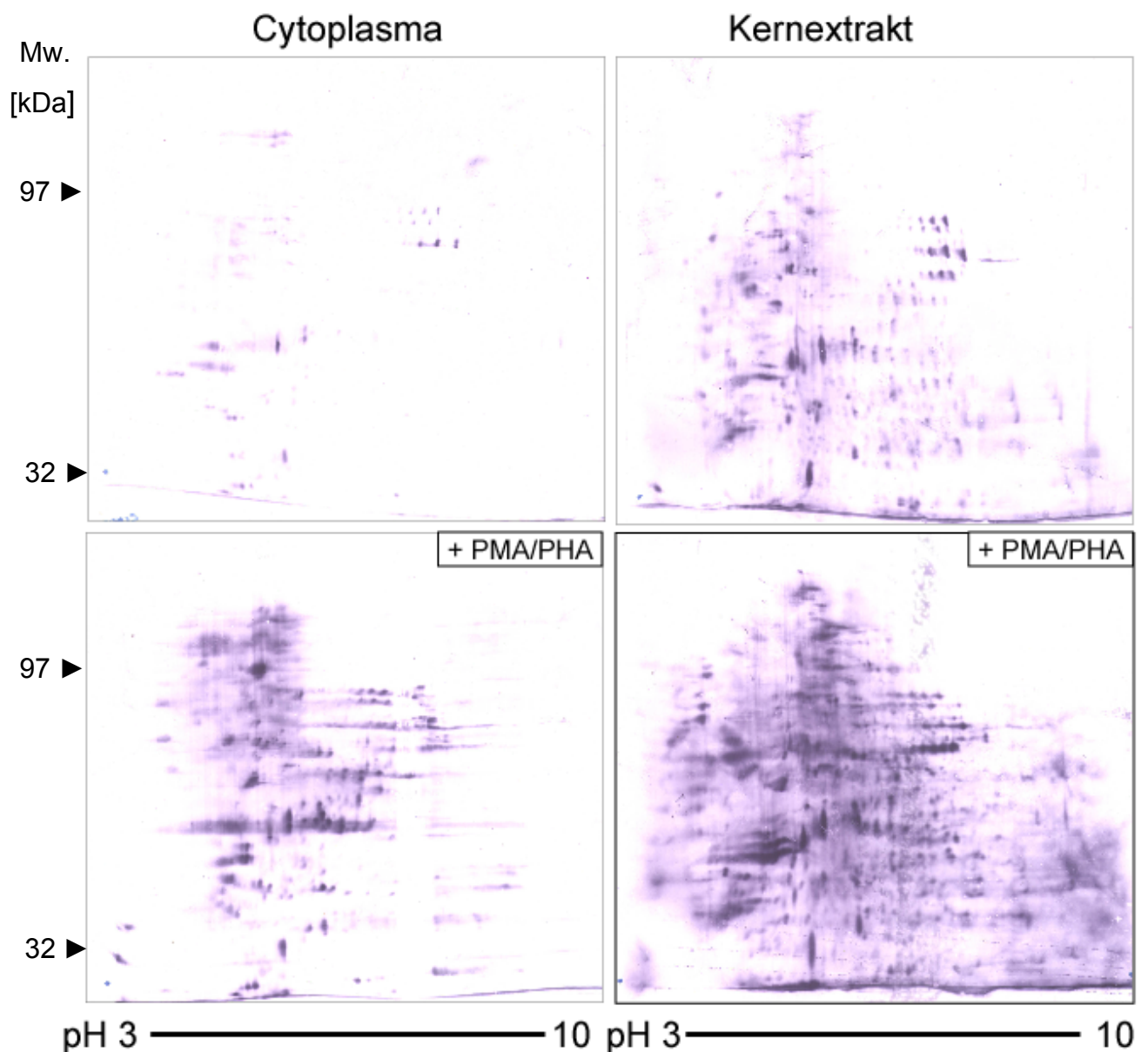
(B) GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N bindet spezifisch Zellkernproteine im Far-Western-Blot. Durchgeführt nach dem Standard-Protokoll erlaubt die Far-Western-Methode die Detektion einer Vielzahl von Proteinen im Cytosol, in Kern- und Chromatin-Extrakten aus Jurkat-Zellen, während die Detektion mit GST kein Signal erzeugt (nicht dargestellt).

Ausschaltung der Hauptbindungsstelle für NLS durch Deletion oder durch Konkurrenz mit SV40-NLS-Peptid verringert die Zahl der detektierten Proteine deutlich. Ebenso werden nach chemischer Modifikation von Arginin-Resten nur noch wenige Proteine erkannt. Das Muster unterscheidet sich in diesem Fall von dem der anderen Spezifitätskontrollen. Eine Durchführung des Experimentes bei geringerer Ionenstärke (150 mM NaCl) führt offenbar nicht zur Erkennung weiterer Proteine.



### 3.3.2 Differentiell exprimierte Kernproteine in primären T-Lymphocyten

Nach erfolgreichem Durchlaufen dieser wichtigen Kontrollen sollte die Methode zur Bestimmung signalabhängiger Proteinexpression in der T-Zell-Aktivierung (s. Abschnitt 3.2.4) verwendet werden. Cytoplasmatische Extrakte und Kernextrakte aus stimulierten und unstimulierten T-Zellen wurden in auf einem 2D-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Zellkernproteine mit Importin  $\alpha$  detektiert (Abbildung 3-9).



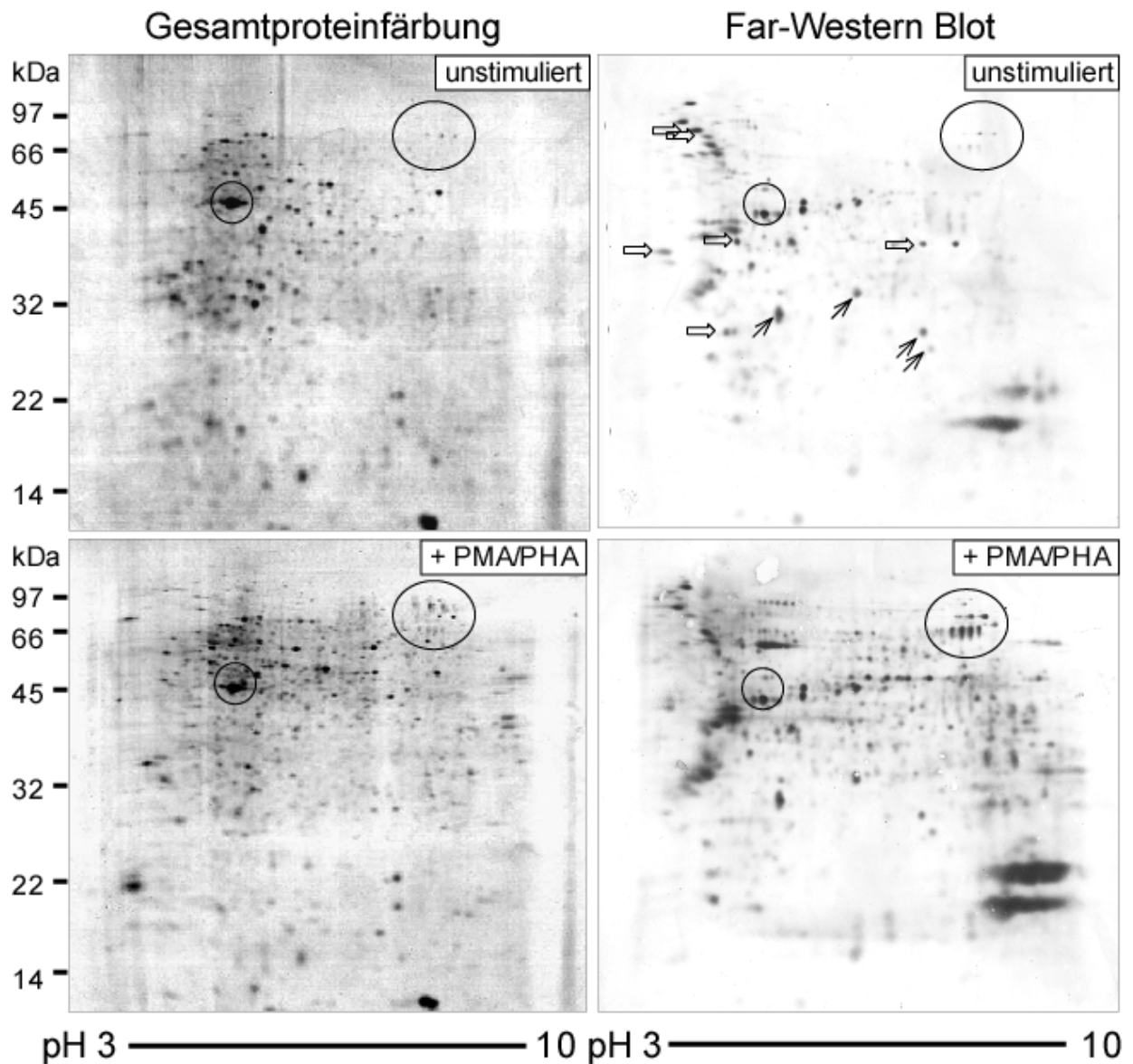
**Abbildung 3-9: Differentielle Expression in der T-Zell-Aktivierung visualisiert mit Kernproteinfärbung von cytoplasmatischer Fraktion und Kernextrakt.** Primäre T-Zellen wurden aus humanen Buffy-Coat-Fraktionen isoliert und die Hälfte davon mit Phytohemagglutinin (PHA) und Phorbol ester (PMA) stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen fraktioniert und der Kernextrakt mittels 2D-PAGE auf einem linearen Gradienten pH 3-10 aufgetrennt. Der Vergleich stimulierter Zellen mit der Kontrolle zeigt Überexpression einer Vielzahl von Proteinen in beiden Zellfraktionen. Die Mehrzahl der Proteine, die im cytoplasmatischen Extrakt erkannt werden, treten ebenfalls im Kernextrakt auf.

Die Zahl der detektierbaren Proteine nimmt durch die Stimulation mit PMA/PHA sowohl in Kernextrakt als auch cytoplasmatischem Extrakt deutlich zu. Die meisten NLS-Proteine der cytoplasmatischen Fraktion treten auch im Kernextrakt auf.

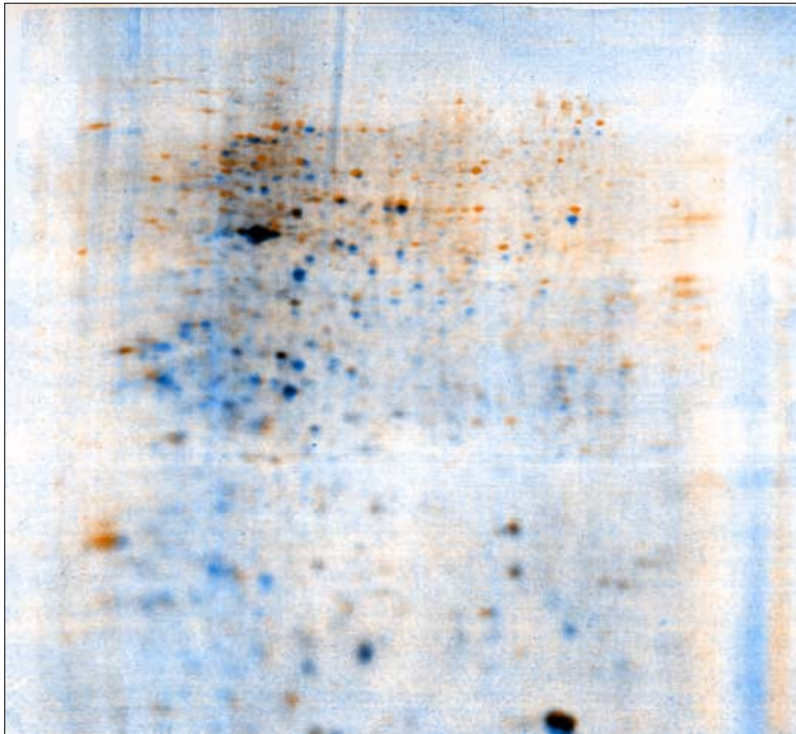
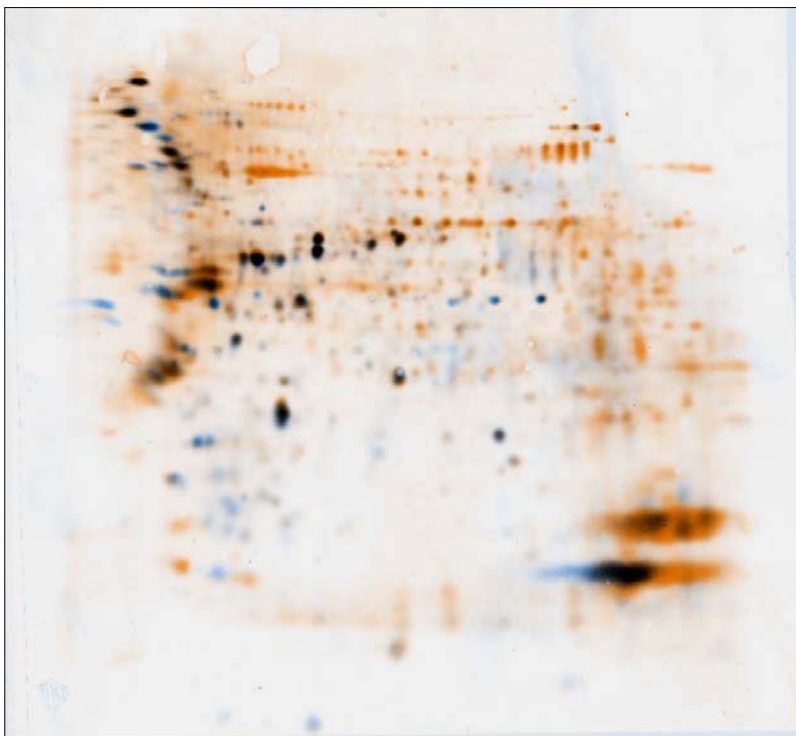
Das vorhergehende Experiment sollte mit einigen wichtigen Änderungen reproduziert werden. Dabei wurden statt einer Untersuchung der cytoplasmatischen Proteine die Ergebnisse des Far-Western-Blot mit einer Gesamtproteinfärbung verglichen. Es wurde ein Extrakt aus Zellen anderer Patienten verwendet, um die wesentlich deutlichere Färbung der Proteine aus stimulierten Zellen zu reproduzieren. Da im ersten Experiment offenbar Verzerrungen aufgrund hoher Proteinmengen auftraten, wurde in der ersten Dimension statt des linearen pH-Gradienten (IPG 3-10 L, 13 cm) ein größerer, nichtlinearer Gradient gewählt (IPG 3-10 NL, 18 cm), der die Proteine mit einem pI im Bereich 4-7 weiter auftrennt.

Bereits in den silbergefärbten Gelen sind eine Vielzahl differentiell exprimierter Proteine zu erkennen (Abbildung 3-10). Zahl und Intensität der Spots in jedem Gel unterscheiden sich jedoch nur geringfügig. Im Far-Western-Blot dagegen ergeben sich erneut deutliche Unterschiede. Sowohl die Zahl der detektierten Proteine als auch die Intensität vieler Spots nehmen durch die Stimulierung zu. Eine deutlich geringere Anzahl von Spots nimmt durch die T-Zell-Aktivierung in der Intensität ab oder verbleibt ihrem Niveau. Die aus den Gelen/Western Blots erstellten Überlagerungsbilder (Abbildung 3-11) illustrieren die Vorteile der Far-Western-Methode in der Detektion differentieller Proteinexpression.

Zwei Proteine aus dem silbergefärbten Gel (unbehandelte Zellen) konnten im Massenspektrometer bestimmt werden. Es handelte sich um den deutlichsten Spot des gesamten Gels bei etwa 45 kDa und um einen weiteren deutlichen Spot mit geringfügig höherem pI bei etwa 40 kDa. Beide Spots bestanden aus Aktin-Isoformen die keine NLS enthalten und waren demzufolge im Far-Western-Blot nicht zu sehen. Dagegen war der Spot bei 45 kDa bereits im Gegenlicht auf der Membran zu erkennen und konnte mittels Amido Black angefärbt werden.



**Abbildung 3-10: Differentielle Expression in der T-Zell-Aktivierung visualisiert mittels Gesamtproteinfärbung und Far-Western-Blot.** Primäre T-Zellen wurden aus humanen Buffy-Coat-Fractionen isoliert und die Hälfte davon mit Phytohemagglutinin (PHA) und Phorbol ester (PMA) stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen fraktioniert und der Kernextrakt mittels 2D-PAGE auf einem nichtlinearen Gradienten pH 3-10 aufgetrennt. Gele für die Gesamtproteinfärbung und den Far-Western-Blot wurden parallel mit jeweils 100 µg Protein hergestellt. Beide Methoden detektieren eine Vielzahl von Proteinen, doch die Muster beider Färbungen unterscheiden sich deutlich. Viele der Spots, die im Far-Western-Blot auftreten, werden im silbergefärbten Gel nicht erkannt. Während nur wenige Spots in der unstimulierten Probe überrepräsentiert sind (Blockpfeile) und einige vergleichbar abundant sind (einfache Pfeile), wird eine Vielzahl von NLS-Proteinen im Zuge der T-Zell-Aktivierung überexprimiert. Zwei Gruppen von Spots (Ellipsen) wurden verwendet, um die Bilder gleichmäßig auszurichten. Der deutlichste Spot in der Gesamtproteinfärbung (linke Ellipse) besteht aus Aktin und ist auf den diesen Bildern des Far-Western-Blot nicht zu sehen.

**Gesamtprotein****PTL****PTL + PMA/PHA****Far-Western-Blot****PTL****PTL + PMA/PHA****Abbildung 3-11: Differentielle Expression in der T-Zell-Aktivierung - Überlagerungsbilder.**

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.10 wurden zur Erstellung elektronischer Überlagerungsbilder verwendet. Hierbei sind Proteine unstimulierter T-Zellen blau und die Proteine aktivierter T-Zellen orange dargestellt. Spots gleicher Intensität erscheinen schwarz. Mit Hilfe der Far-Western-Blot-Färbung von Kernproteinen wird eine deutlich höhere Zahl differentiell exprimierter Proteine gefunden als in der Gesamtproteinfärbung.

### 3.3.3 Aufreinigung von NLS-Kernproteinen mittels GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N

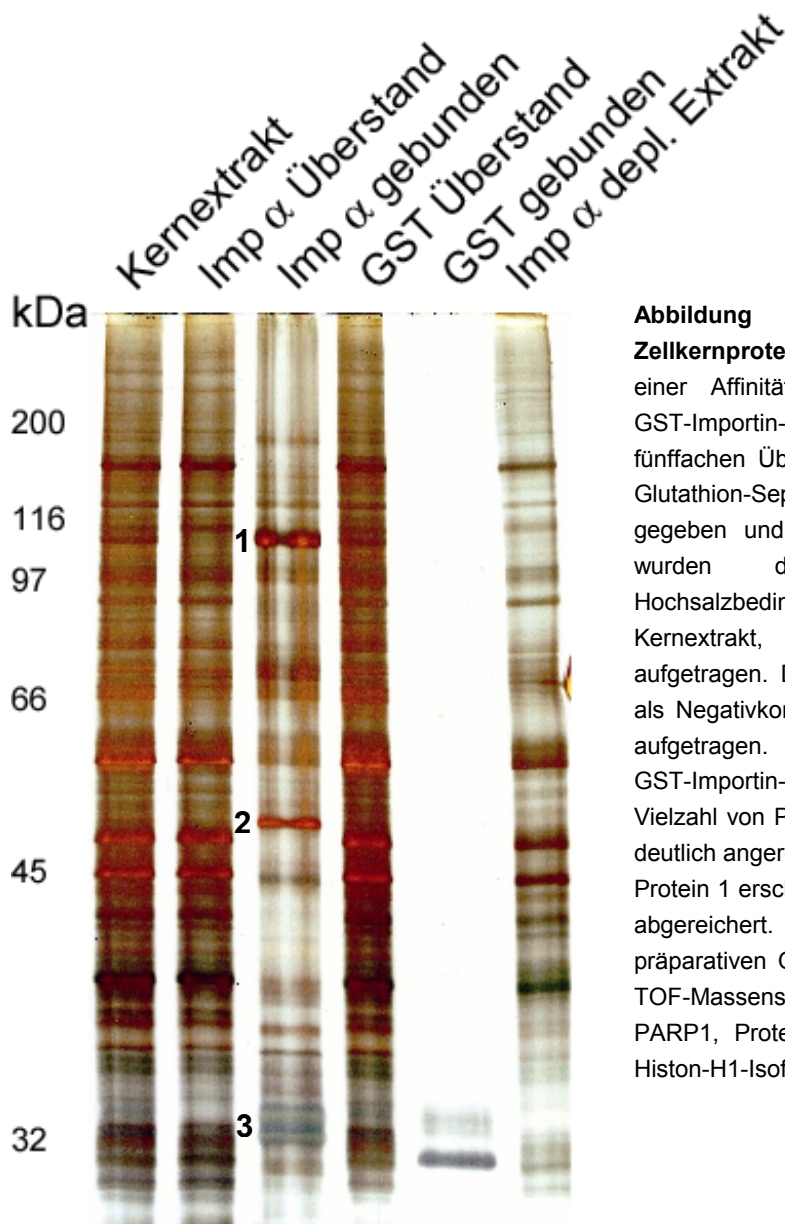
Analog zu den Motivantikörpern sollte das dereprimierte Importin  $\alpha$  zur Aufreinigung seiner Interaktionspartner i.e. NLS-Proteine verwendet werden. Es wurde hierzu auf einer Glutathion-Sepharose-Säule immobilisiert und mit HeLa-Zellkernextrakt inkubiert. Diese Inkubation und die anschließenden Waschschrte fanden bei einer Ionenstärke entsprechend 150 mM KCl/NaCl statt, um ein Minimum an Spezifität zu gewährleisten und gleichzeitig auch schwächere Wechselwirkungen zu erfassen. Die Elution erfolgte durch Erhöhung der Ionenstärke auf ein Niveau entsprechend 1-2 M KCl.

Das Extraktprotein wurde im fünffachen Überschuß gegenüber dem Fusionsprotein eingesetzt. Ein zwanzigstel davon band an die Säule und befand sich im Eluat. Der Auftrag gleicher Proteinmengen von Extrakt, Überstand und Eluat zeigt eine deutliche Anreicherung weniger Proteinspezies in der Eluatfraktion. Dadurch bedingt erscheinen bei ähnlichem Bandenmuster viele Proteine des Zellkernextrakts als abgereichert. Nicht alle Proteine des Extraktes banden an die Säule.

Die angereicherten abundanten Proteine konnten massenspektrometrisch bestimmt werden und sind in Tabelle 3-3 aufgeführt. Die Proteine dek und PARP1 enthalten beide eine zweiteilige NLS (*bipartite*). Histon H1 enthält mehrere klassische und nicht-klassische NLS und sein Transport in den Zellkern wird von Importin- $\alpha$ -7/Importin beta vermittelt (Bauerle et al. 2002). Allerdings können die klassischen NLS *in vitro* auch von anderen Importin- $\alpha$ -Isoformen wie des verwendeten Importin- $\alpha$ -1 gebunden werden.

Protein	Uniprot	#	Mw.		Kernlokalisationssignal
	Accession		th.	pl	
1) PARP1	P09874	210	113	8,99	<b>KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK</b>
2) Dek Proto-Onkogen	P35659	123	43	8,69	<b>KKERNSSG MARKAKRTK</b>
3) Histon H1		43	21	ca. 11	

**Tabelle 3-3: Durch Affinitätschromatographie mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N angereicherte Proteine.** Das theoretische (Mw. th.) Molekulargewicht, der pl und die NLS des Proteins sind aufgeführt. Die Genauigkeit der massenspektrometrischen Bestimmung ist als *Mascot-Score* (#) angegeben. Die Bestimmung des Histon H1 erreichte keinen signifikanten Wert, die Bande konnte aber aufgrund des Molekulargewichts zugeordnet werden.



**Abbildung 3-12: Anreicherung verschiedener Zellkernproteine aus Zellkernextrakt.** Silbergefärbtes Gel einer Affinitätschromatographie mit säulengebundenem GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N. HeLa-Zellkernextrakt wurde im fünffachen Überschuß (berechnet auf Gesamtprotein) auf Glutathion-Sepharose-gebundenes GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N gegeben und inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine unter Hochsalzbedingungen eluiert. Jeweils 15  $\mu$ g Protein aus Kernextrakt, Säulenüberstand und Eluat wurden aufgetragen. Das Experiment wurde gleichzeitig mit GST als Negativkontrolle durchgeführt und Volumenäquivalente aufgetragen.

GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N bindet im Gegensatz zu GST eine Vielzahl von Proteinen aus dem Extrakt. Einige davon sind deutlich angereichert (1-3).

Protein 1 erscheint im extrahierten Überstand zusätzlich als abgereichert. Die Eluatfraktion wurde auf einem präparativen Gel aufgetrennt und Proteine 1-3 im MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmt. Protein 1 wurde als PARP1, Protein 2 als dek und die Doppelbande 3 als Histon-H1-Isoformen bestimmt.

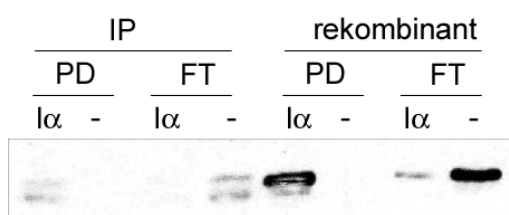
### 3.3.4 Untersuchung des Negativen Cofaktors 2 (NC2) auf eine funktionale NLS

Neben der Aufreinigung von Kernproteinen aus komplexen Gemischen sollte es möglich sein, das Vorhandensein einer funktionalen NLS in einem definierten Protein zu überprüfen. Der Negative Cofaktor 2 (NC2) liegt als Heterodimer aus den Untereinheiten NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  vor. NC2 ist sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Die Untereinheit NC2 $\alpha$  enthält einen Sequenzabschnitt, der die Kriterien zur Vorhersage von NLS erfüllt. In mitotischen Zellen erscheint eine hyperphosphorylierte Form von NC2 $\alpha$ . Es sollte untersucht werden, ob die



Phosphorylierung einen signifikanten Einfluß auf die Bindung durch Importin  $\alpha$  hat, welches das Importverhalten des Proteins verändern würde.

Der NC2-Heterodimer wurde mittels Immunaффinitätschromatographie aus Kernextrakt gereinigt und mittels Epitop-Peptid unter nativen Bedingungen eluiert. Bei 150 mM KCl konnten beide Isoformen des NC2 $\alpha$  im nativen Dimer an Importin  $\alpha$  binden. Ebenfalls wurde ein heterolog in *E. coli* exprimierter NC2-Heterodimer durch Importin  $\alpha$  gebunden.



**Abbildung 3-13: Pulldown von NC2 $\alpha$  mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N und Nachweis im Western Blot.** Beide Isoformen von NC2 $\alpha$  werden von Importin  $\alpha$  gebunden (PD). NC2 bindet nicht an GST (-) und verbleibt vollständig im Säulenüberstand (FT). Dies gilt für natives (IP) und rekombinantes (eine Isoform/Bande) NC2.

### 3.4 Proteinbiochemische Analyse des humanen Mediator-Komplexes

Die Methoden zur Zellfraktionierung, zur 2D-Gelelektrophorese und zur MALDI-Massenspektrometrie sollten auf eine Untersuchung der humanen Mediator-Komplexe angewandt werden. Beispielsweise waren zum Zeitpunkt der Experimente mehrere Mediator-Untereinheiten noch nicht beschrieben worden. Es waren Interaktionen mit der RNA Polymerase II und eine Vielzahl von Aktivatoren bekannt. Darüber hinaus sind jedoch Interaktionen mit weiteren Komponenten der transkriptionellen Maschinerie wahrscheinlich.

Eine Aufreinigung im Großmaßstab sollte es ermöglichen, sowohl neue Untereinheiten als auch potentielle Interaktoren zu identifizieren und eine Aufreinigung über die Pol II-CTD sollte eine funktionale Trennung der Komplexe ermöglichen.

Mediator-Komplexe bestehen aus mehr als 20 Untereinheiten mit einem gesamten Molekulargewicht von 1-2 MDa. Aufgrund der Größe, der langgestreckten Form und Inhomogenitäten in der Zusammensetzung sind Mediatoren üblicherweise nur mit mehreren hintereinandergeschalteten Chromatographieschritten aufzureinigen, die einen Verlust von Untereinheiten zur Folge haben können. Deshalb wurde in dieser Arbeit durchgängig auf die Affinitätschromatographie mit Antikörpern als leistungsfähigstes Trennverfahren zurückgegriffen.

### 3.4.1 Erstellung einer zweidimensionalen Karte des Mediator-Komplexes

Die großen Untereinheiten des Mediator-Komplexes und ihr Laufverhalten in der 1D-PAGE sind in der Literatur bekannt, welches eine schnelle Zuordnung ermöglicht. Die Trennschärfe der 1D-PAGE nimmt dagegen im Bereich niedriger molekularer Massen ab. Zudem befinden sich sehr viele Untereinheiten im Massenbereich  $< 60$  kDa, welche nur unzureichend voneinander getrennt werden und kein charakteristisches Muster ergeben. Eine massenspektrometrische Analyse solcher Proteingemische ist durch physikalische Effekte wie die gegenseitige Beeinflussung von Teilchen während der Ionisation und durch das Fehlen entsprechender Softwarealgorithmen erschwert.

Die 2D-Gelelektrophorese dagegen fügt der Auftrennung nach Molekulargewicht eine Fokussierung auf den Isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins hinzu. Kommerziell verfügbare immobilisierte pH-Gradienten (IPG) machen die 2D-PAGE zu einer reproduzierbaren Technik, die üblicherweise alle Proteine in einem Gemisch voneinander trennt und jeweils durch zwei Koordinaten kennzeichnet.

Von den in Labor verfügbaren Mediator-Antikörpern wies der Klon 6C9 (MED15) die größte Spezifität auf. Allerdings ist die Affinität zum Antigen geringer als bei den MED15-1H7 und MED25-9C2-Antikörpern, so daß bei jeder Immunpräzipitation ein signifikanter Teil des Mediators im Überstand zurückblieb. Die Antikörper-Antigen-Bindung richtet sich nach dem Massenwirkungsgesetz und ist daher abhängig von den Konzentrationen beider Interaktoren. Bei weitgehend festgelegter Konzentration des immobilisierten Antikörpers, musste grundsätzlich auf eine relativ hohe Konzentration des Mediators im Extrakt hingearbeitet werden. Die negativen Effekte niedriger Konzentration konnten bei Experimenten mit verdünnten Extrakten bestätigt werden (nicht abgebildet).

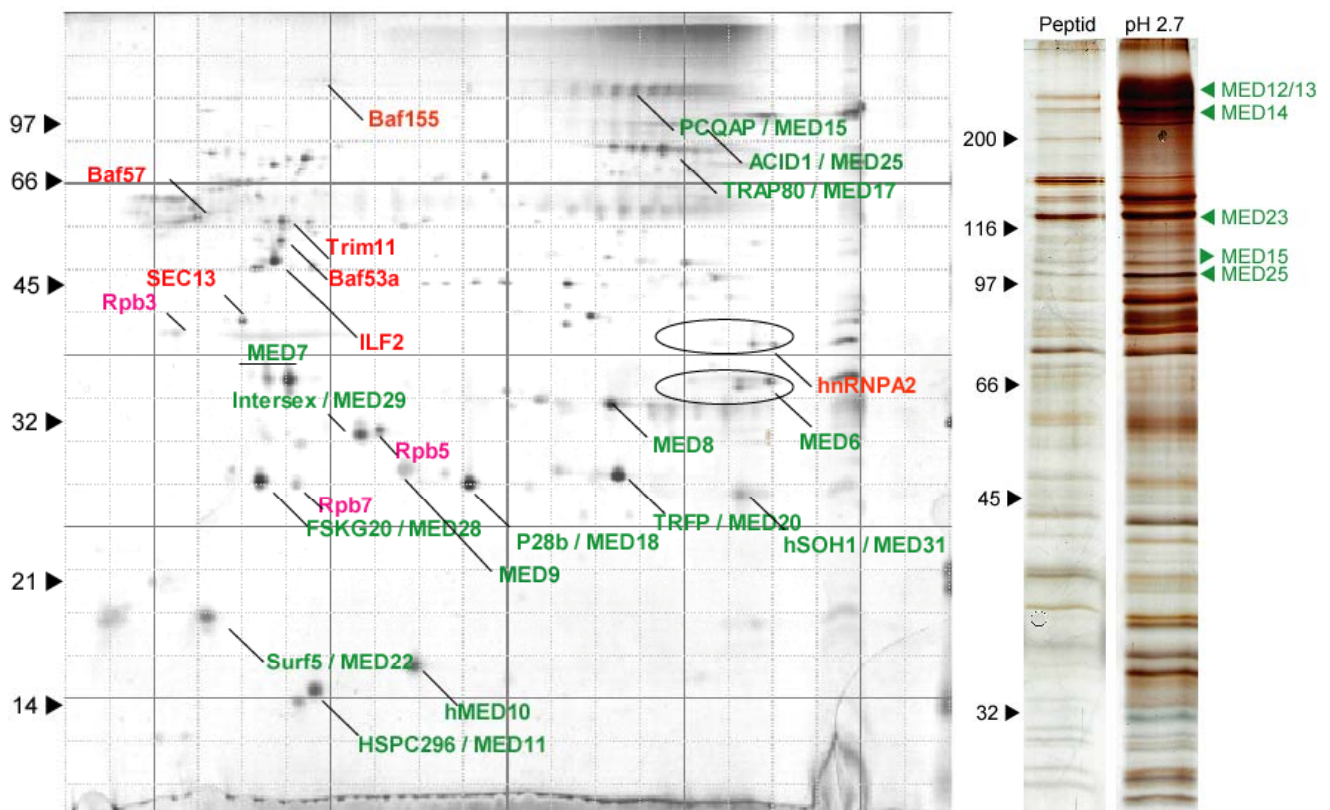
Zur Aufreinigung einer großen Menge Mediator-Komplex für die 2D-PAGE wurden 25 ml Hela-Zellkernextrakt nacheinander auf eine IgG-Isotyp-Säule und eine Säule mit dem MED15-Antikörper 6C9 gegeben (jeweils ca. 1 ml beladen mit 1 mg/ml Antikörper). Die Molarität von Kaliumchlorid in den verwendeten Puffern war entscheidend für die Bindung und das Ablösen unspezifisch interagierender Proteine. Um ein Minimum an Spezifität zu erreichen war eine Konzentration von 150-200 mM KCl notwendig.

Die Bindungsreaktion wurde daher bei der Salzkonzentration des Extraktes (400 mM) durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit einem großen Überschuß BC1000 (1000 mM KCl) gewaschen. Es war geplant, den gebundenen Komplex mit Hilfe des Epitop-Peptides zu eluieren. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C



durchgeführt. Anschließend wurde eine Immunaффinitätschromatographie mit dem MED25-Antikörper 9C2 durchgeführt, um einen hochgereinigten Komplex zu erhalten. Allerdings war die Peptidelution unter diesen (und vielen anderen Bedingungen auch) sehr ineffizient, so daß sich der größte Anteil des Komplexes noch auf der anti-MED15-Säule befand. Er wurde mittels pH-Sprung auf pH 2.7 eluiert und diente als Grundlage für die weiterführenden Experimente.

Zur Erstellung eines silbergefärbten Geles wurden 250 µg Protein mittels eines nichtlinearen pH-Gradienten pH 3-10 aufgetrennt (Abbildung 3-14). Parallel wurde ein Volumenäquivalent der Isotyp-Kontrolle aufgetrennt. Es ist eine Vielzahl von Spots erkennbar, die sich ausschließlich in der Mediator-Präparation befindet. Mehrere Gruppen dieser Spots zeigen ein identisches Laufverhalten in der zweiten Dimension.



**Abbildung 3-14: Eindimensionale (B) und zweidimensionale (A) Auftrennung des Mediator-Komplexes.** (A) Der Mediator-Komplex wurde aus Hela-Kernextrakt mit dem MED15-Antikörper 6C9 gereinigt und 250 µg für die Silberfärbung bzw. 400 µg für eine Kolloidal-Coomassie-Färbung mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Das silbergefärbte Gel (abgebildet) diente als Vorlage für das Ausschneiden der Spots aus dem Coomassie-gefärbten Gel zur Verwendung in der MALDI-MS.

Alle untersuchten Proteine konnten bestimmt werden. Sie sind farblich gekennzeichnet als Mediator-Untereinheiten (grün), Pol II Untereinheiten (rosa) und potentielle Interaktoren (rot). (B) Durch Epitopeptid bzw. pH-Sprung eluierter Mediator aus der gleichen Aufreinigung aufgetrennt im 1D-PAGE-Gel. Die großen Mediator-Untereinheiten lassen sich nach Erfahrungswerten zuordnen.

In diesem Gel konnten nur drei Mediator-Untereinheiten massenspektrometrisch identifiziert werden, was allgemeinen Erfahrungen mit silbergefärbten Gelen entspricht. Aus diesem Grund wurden erneut 400 µg der Präparation aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Analyse mittels Peptide Mass Fingerprint (PMF) und MS/MS ermöglichte die Identifikation aller ausgeschnittenen Spots und eine Zuordnung zu dem silbergefärbten Gel.

Neben 15 Mediator-Untereinheiten wurden drei Pol II Untereinheiten (Rpb3, Rpb5, Rpb7), drei Polypeptide des BAF- bzw. SWI/SNF-Komplexes (BAF53, BAF57, BAF155) und vier weitere Proteine gefunden, die offenbar spezifisch gebunden wurden.

### 3.4.2 Assoziation des Mediator-Komplexes mit dem SWI/SNF-Komplex und Pol II

In mehreren Mediator-Präparationen mit MED15- und MED25-Antikörpern wurden neben der Pol II Untereinheiten des SWI/SNF-Chromatinumformungskomplexes gefunden. Dies deckt sich mit vorläufigen früheren Beobachtungen (G. Mittler, T. Stühler, M. Meisterernst, pers. Kommunikation). Über die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes an Promotor-Regionen ist derzeit nur wenig bekannt. Eine Verbindung zum Mediator-Komplex könnte eine Erklärung für dessen positive Effekte in der Transkription liefern.

Offenbar bindet der SWI/SNF-Komplex selbst bei 400-1000 mM KCl in Lösung an den Mediator-Komplex. Dies zeigt bereits, daß die Interaktion nicht allein auf schwachen ionischen Wechselwirkungen beruht. Die Empfindlichkeit der Bindung gegenüber ansteigender Ionenstärke wurde daher genauer untersucht.

Es wurde eine MED15-Immunaффinitätschromatographie (6C9-Antikörper) mit nach dem NAM-Protokoll hergestelltem Hela-Kernextrakt durchgeführt, der eine Ionenstärke entsprechend ca. 210 mM NaCl besitzt. Nach umfangreichen Waschschritten bei 220 mM KCl (BC220) wurde nacheinander mit BC400, BC750, BC1000 und BC1500 für je 45 min eluiert. Dazwischen folgte jeweils ein kurzer Waschschriff mit dem vorherigen Elutionspuffer, um die Trennung der Fraktionen zu verbessern.

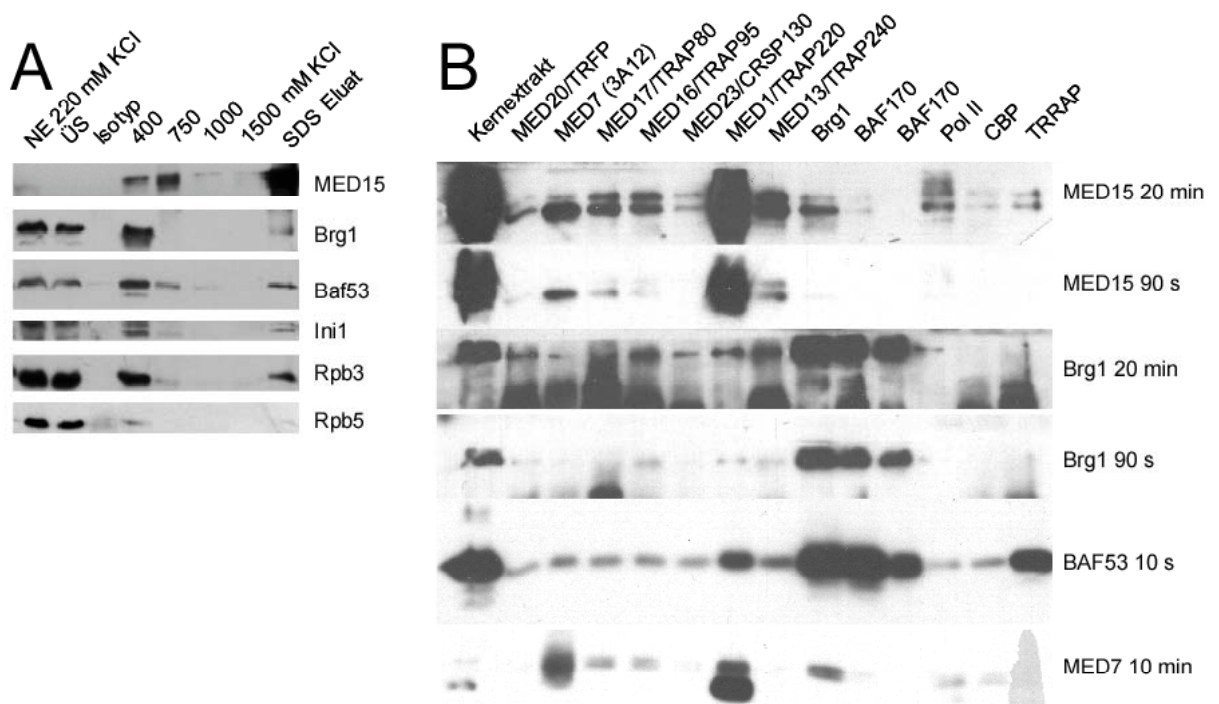
Die Bindung von MED15 an seinen Antikörper ist sehr stabil. Der größte Anteil bleibt selbst bei 1500 mM KCl gebunden, während sich ein kleiner Teil bei 400-750 mM KCl von der Säule löst.

Pol II und der SWI/SNF-Komplex zeigen ein zueinander vergleichbares Verhalten, das sich von dem des Mediators unterscheidet. Beide Komplexe eluieren zum größten Teil bei 400 mM KCl, während ein kleiner Teil auch bei sehr hoher Ionenstärke auf der Säule bleibt.

Allein MED15 erscheint im Überstand der Immunpräzipitation deutlich abgereichert. Offenbar liegen Pol II und der SWI/SNF-Komplex in Kernextrakten gegenüber Mediator im großen Überschuß vor oder es bindet jeweils nur ein geringer Teil dieser Komplexe an Mediator.

Um diese Bindung aus einer anderen Richtung zu überprüfen wurden verschiedene Antikörper gegen Mediator, SWI/SNF, Pol II, CBP und gegen TRRAP, das ebenfalls im Komplex mit BAF53 vorliegt, in der Immunpräzipitation verwendet. Das

Experiment wurde bei konstant 220 mM NaCl/KCl durchgeführt. Allein der MED1/TRAP220-Antikörper bindet eine größere Menge Mediator. Der Gehalt an BAF53A ist in dieser Fraktion leicht erhöht, ähnlich der TRRAP-Immunpräzipitation. Die Brg1 und Pol II-Antikörper binden etwas erhöhte, aber kaum signifikante Mengen Mediator in diesem Experiment.



**Abbildung 3-15: Mediator-SWI/SNF-Assoziation.** (A) Einfluß der Ionenstärke auf die Assoziation von Mediator mit dem SWI/SNF-Komplex. Mediator-Komplex wurde aus Kernextrakt bei 220 mM KCl an eine Antikörper-Säule gebunden und durch Waschschrte gereinigt. Anschließend wurden schwach assoziierte Proteine sequentiell mit ansteigenden KCl-Konzentrationen von der Säule eluiert. Verbleibende Proteine wurden in SDS-Puffer gelöst. Sowohl Pol-II- (Rpb3 und -5) als auch SWI/SNF-Untereinheiten (Brg1, BAF53 und Ini1) sind in der Mediator-IP im Gegensatz zur Isotyp-IP vorhanden. Der Großteil davon wird bereits bei 400 mM KCl eluiert, während ein kleinerer Anteil auch bei hohen Ionenstärken an Mediator gebunden bleibt. (B) Immunpräzipitation mit verschiedenen kommerziellen Antikörpern insbesondere gegen Mediator- und SWI/SNF-Untereinheiten (Brg1, BAF170) und Überprüfung im Western Blot z.T. mit langen Expositionszeiten.

### 3.4.3 Signalabhängige Phosphorylierung von Mediator-Untereinheiten

Posttranslationale Modifikationen von Mediator-Untereinheiten sind bisher noch nicht eingehender untersucht worden. Es ist möglich, daß sich Mediator-Funktionen nicht nur von der Komposition, sondern auch durch modifizierte Untereinheiten beeinflusst werden.

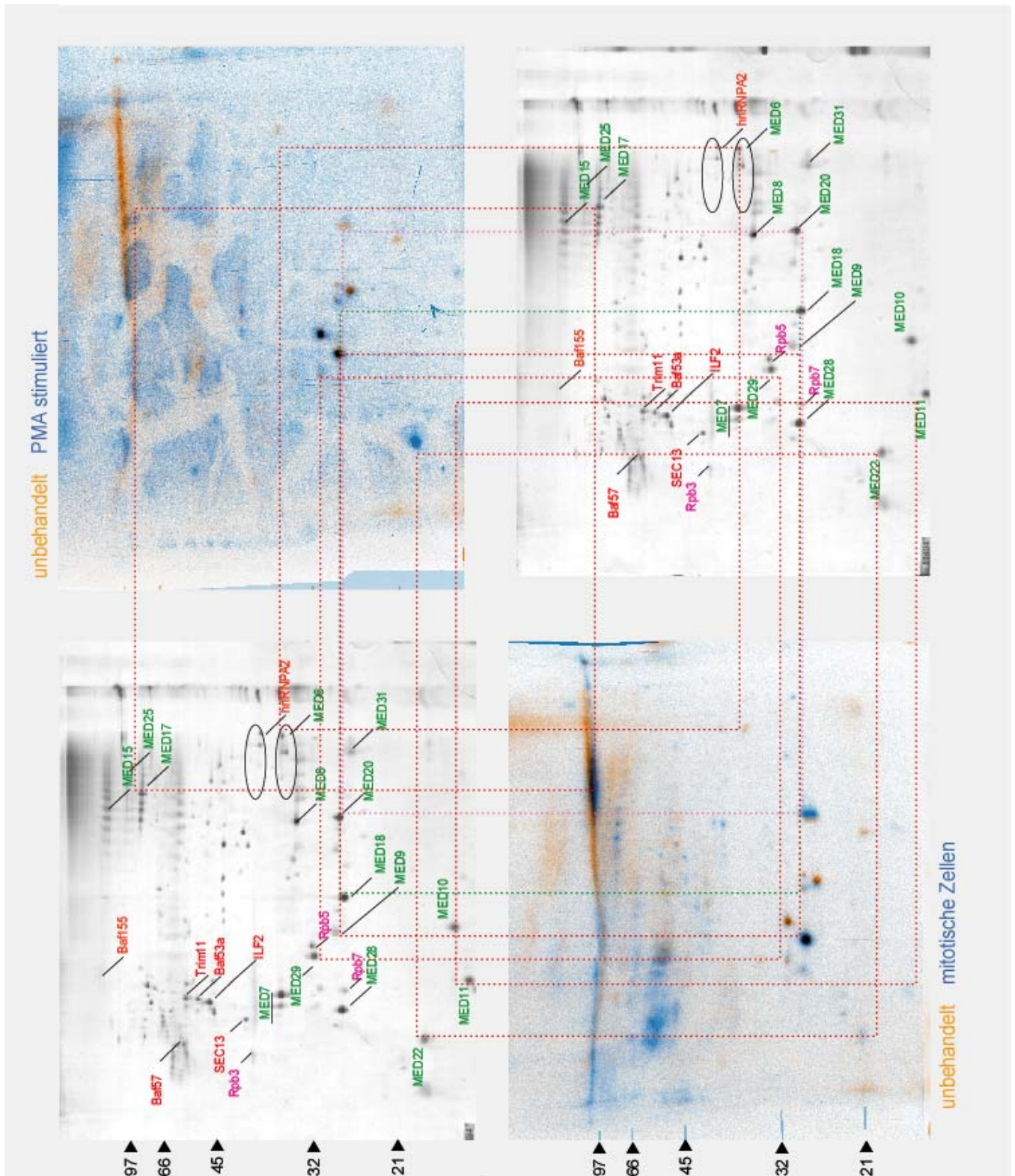
Phosphorylierungen lassen sich durch *in-vivo*-Markierungen mit radioaktivem Phosphat ( $^{32}\text{P}$ ) nachweisen. Die 2D-PAGE sollte dann eine Bestimmung der Untereinheiten sehr erleichtern. Eine massenspektrometrische Analyse der geringen Mengen an markiertem Protein wäre unmöglich, so daß die Karte der Untereinheiten aus Abbildung 3-14 verwendet wird.

Von Elisa Piaia, Abt. Genexpression, GSF München wurden entsprechend behandelte Gesamtzellextrakte aus Hela-Zellen übernommen. Neben logarithmisch gewachsenen Kontrollzellen wurden in der Mitose arretierte (600 ng/ml Nocodazol, 16 h) und mit PMA stimulierte Zellen verarbeitet. Es wurde eine Immunpräzipitation aus Gesamtzellextrakten mit dem MED15-Antikörper 6C9 bei 150 mM NaCl durchgeführt. Nach Waschschritten von 200 SV BC1000 wurde der markierte Mediator direkt in 2D-Probenpuffer eluiert und analog Abschnitt 3.4.1 in der 2D-PAGE aufgetrennt.

Das Muster aller drei Proben in der Autoradiographie unterscheidet sich sehr deutlich von dem der 2D-Karte bzw. der Gesamtproteinfärbung. Auch treten erhebliche signalabhängig Unterschiede auf. Die in Abbildung 3-17 gewählte Darstellung ermöglicht aber die Zuordnung vieler Spots.

Demnach werden die Untereinheiten MED6, MED9, MED11/HSPC296, MED17, MED20, MED22 und MED29 phosphoryliert. In mitotischen Zellen betrifft dies insbesondere die Untereinheiten MED9/FLJ10193, MED20/TRFP und MED17/TRAP80, während die Induktion des PKC-Signalweges mit PMA vor allem die Phosphorylierung von MED22/Surf5 bewirkt.





**Abbildung 3-16: Identifikation phosphorylierter Mediator-Untereinheiten mittels *In-vivo*-Markierung.** Markierte Mediator-Untereinheiten wurden im 2D-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Bilder von unbehandelten Zellen (orange) wurde mit denen mitotischer oder PMA-stimulierter Zellen überlagert. Zum Bestimmung der Untereinheiten wurde das annotierte Bild der Mediator-Gesamtproteinfärbung aus der früheren Reinigung doppelt hinzugefügt. Die Bilder sind dahingehend angeordnet, daß zusammengehörende Spots jeweils an den Eckpunkten gleich großer Rechtecke zu finden sind.

### 3.4.4 Phosphozellulose-Chromatographie zur Anreicherung von Mediator-Subpopulationen

In diesem Labor wurde von G. Mittler ein Mediator-Komplex mit basaler Funktion beschrieben (Mittler et al. 2001). Dieser Komplex wurde über eine Phosphozellulose-Säule angereichert und befand sich in der Eluat-Fraktion mit 0.85 M KCl. Der sogenannte B-MED zeichnete sich durch einen reduzierten Anteil an Cdk8 und das Fehlen von MED16/TRAP95 aus. Sowohl das Aufreinigungsschema als auch die Beschreibung der Komposition ist der zweier anderer Komplexe CRSP und PC2 sehr ähnlich. Könnte man die Identität der drei Komplexe bestätigen, so könnte man einerseits die unabhängigen Linien der Forschung zusammenführen und andererseits einen Zusammenhang zwischen basaler (B-MED) und Coaktivatorfunktion (PC2, CRSP) des Mediators herstellen.

Um diesem Ziel näherzukommen, wurde die p11-Phosphozellulosechromatographie mit Hela-Kern- und Chromatinextrakt durchgeführt, um den B-MED Komplex für proteinbiochemische Studien anzureichern. Im Einzelnen wurden hierzu aus ca. 200 ml Hela-Zellkernen die beiden Extrakte hergestellt und nach Dialyse auf 100 mM KCl jeweils auf eine gepackte Säule gegeben. Es wurden mit schrittweise steigenden Salzkonzentration (0.3, 0.5 und 0.85 M KCl) eluiert und die Fraktionen mit hohem Proteingehalt vereinigt.

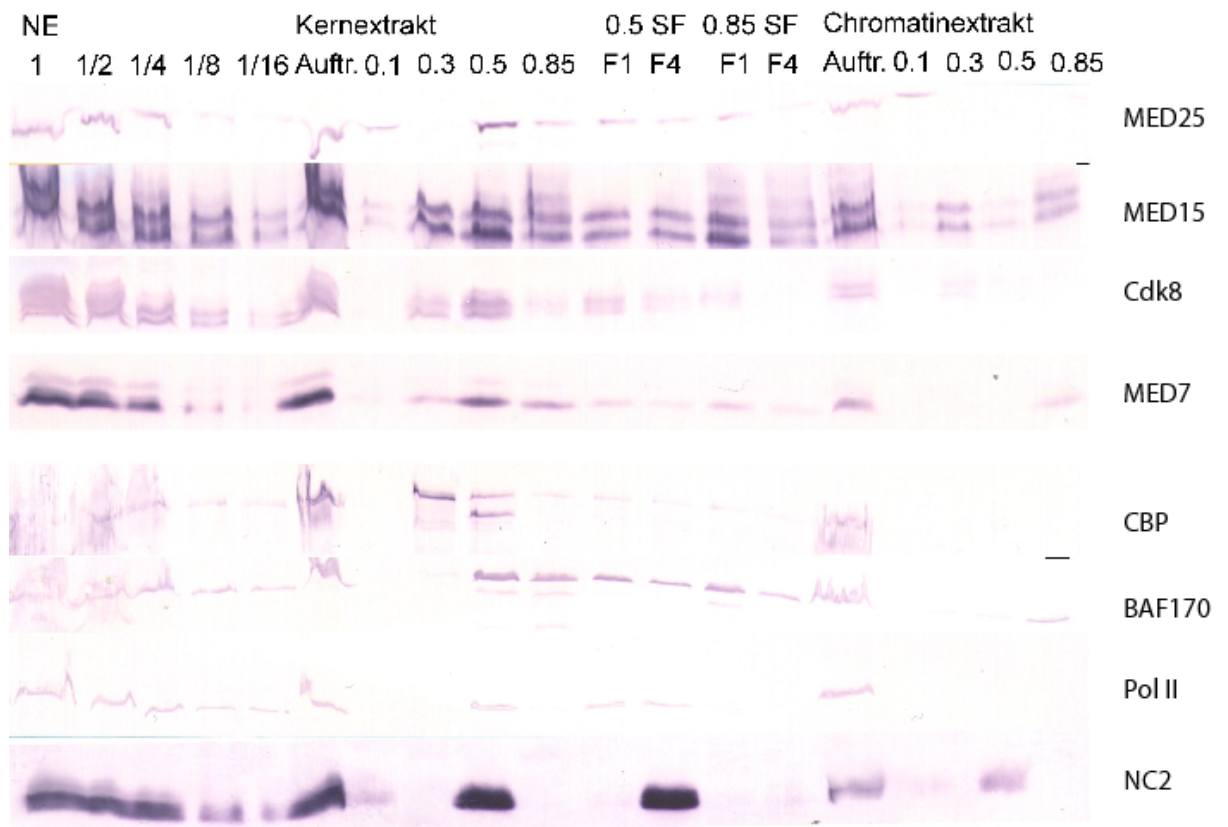
Im Western Blot (Abbildung 3.16) ist zu erkennen, daß diese Art der Chromatographie für manche Proteine und Proteinkomplexe, wie z.B. NC2 $\alpha$  und Pol II eine hohe Trennschärfe erreicht. Beide Proteine befinden sich fast vollständig in der 0.5-M-KCl-Fraktion. Sehr schwach und auf dem Bild nicht sichtbar war spezifisch die Bande der hyperphosphorylierten Form von NC2 $\alpha$  in der 0.85-M-KCl-Fraktion zu erkennen. Auch die Histonacetyltransferase CBP wird in unterschiedliche Formen getrennt. Der SWI/SNF-Komplex (BAF170) befindet sich jeweils etwa zur Hälfte in den 0.5- und 0.85-Fraktionen.

Der Mediator-Komplex ist in den Fraktionen 0.3-0.85 zu finden. Der größte Anteil befindet sich dabei in der 0.5-Fraktion und wesentlich weniger in der 0.85-Fraktion, wobei der Anteil in der „frühen“ Seitenfraktion mit 0.85 M KCl noch deutlich höher ist.

Im Chromatinextrakt gingen manche Proteine durch Ausfallen in der Dialyse verloren. Es ist jedoch zu erkennen, daß MED25 in der 0.1-Chromatin-Fraktion in etwa gleicher Menge wie in der entsprechenden Kernextraktfraktion enthalten ist. Im Vergleich dazu ist NC2 $\alpha$  im Chromatinextrakt deutlich abgereichert. Durch Immunpräzipitation aus

den Fraktionen konnte bewiesen werden, daß MED25 in den 0.1-Fraktionen d.h. auch im Chromatin nicht an den Mediator-Komplex gebunden ist und offenbar als freies Protein vorliegt.

Allein die 0.85-Fraktion des Chromatinextraktes enthält größere Mengen Mediator. In dieser Fraktion und der 0.85-Fraktion des Kernextraktes erscheint Cdk8 als deutlich abgereichert entsprechend den Erwartungen an den B-MED-Komplex.



**Abbildung 3-17: Phosphozellulose-Chromatographie von Kern- und Chromatinextrakt analysiert im Western Blot.** Für jede der beiden Aufreinigungen gleiche Volumina des Extraktes (Auftr.) und der daraus gewonnenen vier Hauptfraktionen aufgetragen (0.1-0.85). Die Seitenfraktionen der Kernextraktaufreinigung befinden sich ebenfalls auf der Membran (SF; F1 / F4). Es handelt sich jeweils um die Fraktionen direkt vor und nach der gemischten Hauptfraktion. Links ist eine Verdünnungsreihe des Kernextraktes aufgetragen, um den Vergleich der Mengen zu erleichtern.

### 3.4.5 Aufreinigung des B-MED-Komplexes mittels MED15-Antikörpern und GST-CTD

Die p11-Fraktionen 0.85 aus Kernextrakt und Chromatinextrakt sollten, wie bereits erläutert, als Ausgangspunkt für die Charakterisierung des B-MED-Komplexes dienen.



Die proteinbiochemischen Aufreinigungsmethoden wurden daher mit einer funktionalen Kontrolle in der *in-vitro*-Transkription auf einem basalen Promotor kombiniert. Ein transkriptionskompetenter Kernextrakt verliert nach Depletion mit Mediator-Antikörpern seine Funktion auf solchen basalen Promotoren. Affinitätsgereinigter B-MED, in immobilisierter Form zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, kann die basale Transkription wiederherstellen.

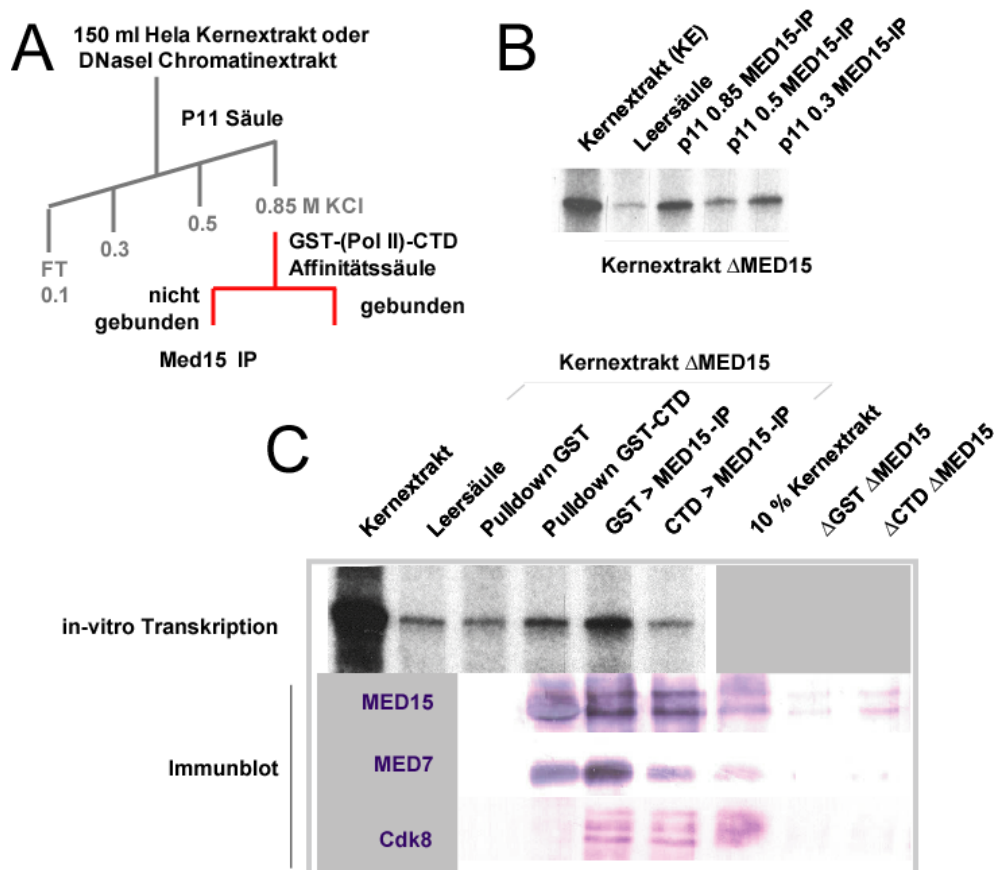
Zur Aufreinigung des B-MED standen die Immunpräzipitation mit dem MED15-Antikörper 1H7 und als neues Verfahren Affinitätschromatographie mit der C-terminalen Domäne der Pol II als GST-Fusionsprotein zur Verfügung. Diese Methode wurde zuvor zur Aufreinigung des Coaktivatorkomplexes CRSP (Naar et al. 2002) verwendet und eine Verknüpfung zum B-MED-Komplex ließe sich leicht herstellen.

In der Immunpräzipitation aus einzelnen p11-Fractionen wurden diese unterschiedlich behandelt, um trotz des unterschiedlichen Gehaltes an Mediator die Bindung vergleichbarer Mengen zu erreichen. Die 0.85-Fraktion wurde mit einem Zentrifugalkonzentrator um den Faktor 5 aufkonzentriert und im gleichen Volumen wie die 0.5-Fraktion eingesetzt. Von der 0.3-Fraktion wurde das doppelte Volumen der 0.5-Fraktion verwendet.

Der Vergleich in der *in-vitro*-Transkription ergab, wie erwartet, daß sich die B-MED-Aktivität weitgehend in der 0.85-Fraktion befindet und der Mediator der 0.5-Fraktion nahezu keine Aktivität besitzt (Abbildung 3-18). Der Mediator aus der 0.85-Fraktion aus Chromatin zeigt eine leicht schwächere Aktivität als der Mediator der entsprechenden Kernextraktfraktion (nicht abgebildet).

Anschließend wurde überprüft, ob die B-MED-Aktivität an die Pol II-CTD binden kann. Hierzu wurde die 0.85-Fraktion fünffach aufkonzentriert und auf 150 mM KCl gebracht. Nachdem die Fraktion zweimal mit immobilisiertem GST-CTD extrahiert worden war, wurde der verbleibende Mediator aus dem Überstand immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurde ein paralleles Experiment mit unfusioniertem GST durchgeführt. GST band keinen Mediator-Komplex und so befand sich die gesamte Aktivität schließlich am MED15-Antikörper. Anders bei der CTD-Säule: der MED15-Antikörper band noch etwa die Hälfte der Mediator-Komplexe, erkennbar an den MED7 und MED15-Untereinheiten, aber dieser Komplex besaß keine Aktivität mehr. Auf der CTD-Säule, die in der ersten von zwei Extraktionen verwendet worden war, befand sich noch eine schwache Aktivität. Es ist möglich, daß GST-CTD als kompetitiver Inhibitor in der Transkriptionsreaktion wirkte und die beobachtete

B-MED-Aktivität deshalb geringer als erwartet war. Allerdings hatte die unmittelbare Zugabe von CTD-Säule zu einer Transkriptionsreaktion mit transkriptionskompetentem, unbehandeltem Kernextrakt keinen Effekt (nicht abgebildet). Es ist interessant, daß der inaktive Mediator nach CTD-Extraktion die Gesamtmenge an Cdk8 der 0.85-Fraktion enthält bzw. Cdk8 nicht an CTD bindet.



**Abbildung 3-18: B-MED-Aktivität befindet sich in der p11 0.85 Fraktion und bindet an Pol-II-CTD.**

(A) Aufreinigungsschema des B-MED-Komplexes in dieser Arbeit. B-MED wurde entweder direkt durch IP aus p11 0.85 Fraktion oder durch Affinitätschromatographie mit GST-CTD gereinigt.

(B) Immunpräzipitierter Mediator aus der p11 0.85 Fraktion ist in Lage die basale Aktivität in einer *In-vitro*-Transkription mit MED15-depletierten Kernextrakt wiederherzustellen. (C) B-MED-Aktivität bindet an GST-CTD. Die basale Aktivität aus der p11 0.85 Fraktion bindet an GST-CTD (nicht an GST), aber die transkriptionelle Aktivität ist reduziert. Mit einer nachfolgende MED15-IP läßt sich beobachten, welche Aktivität im Überstand zurückbleibt. Nur nach der Chromatographie mit GST, aber nicht mit GST-CTD befindet sich noch B-MED im Überstand. Der nach GST-CTD-Chromatographie immunpräzipitierte Mediator enthält die gesamte Cdk8-Menge der Fraktion, ist aber transkriptionell inaktiv.

### 3.4.6 Isolierung unterschiedlicher Mediator-Komplexe aus p11-Fraktionen

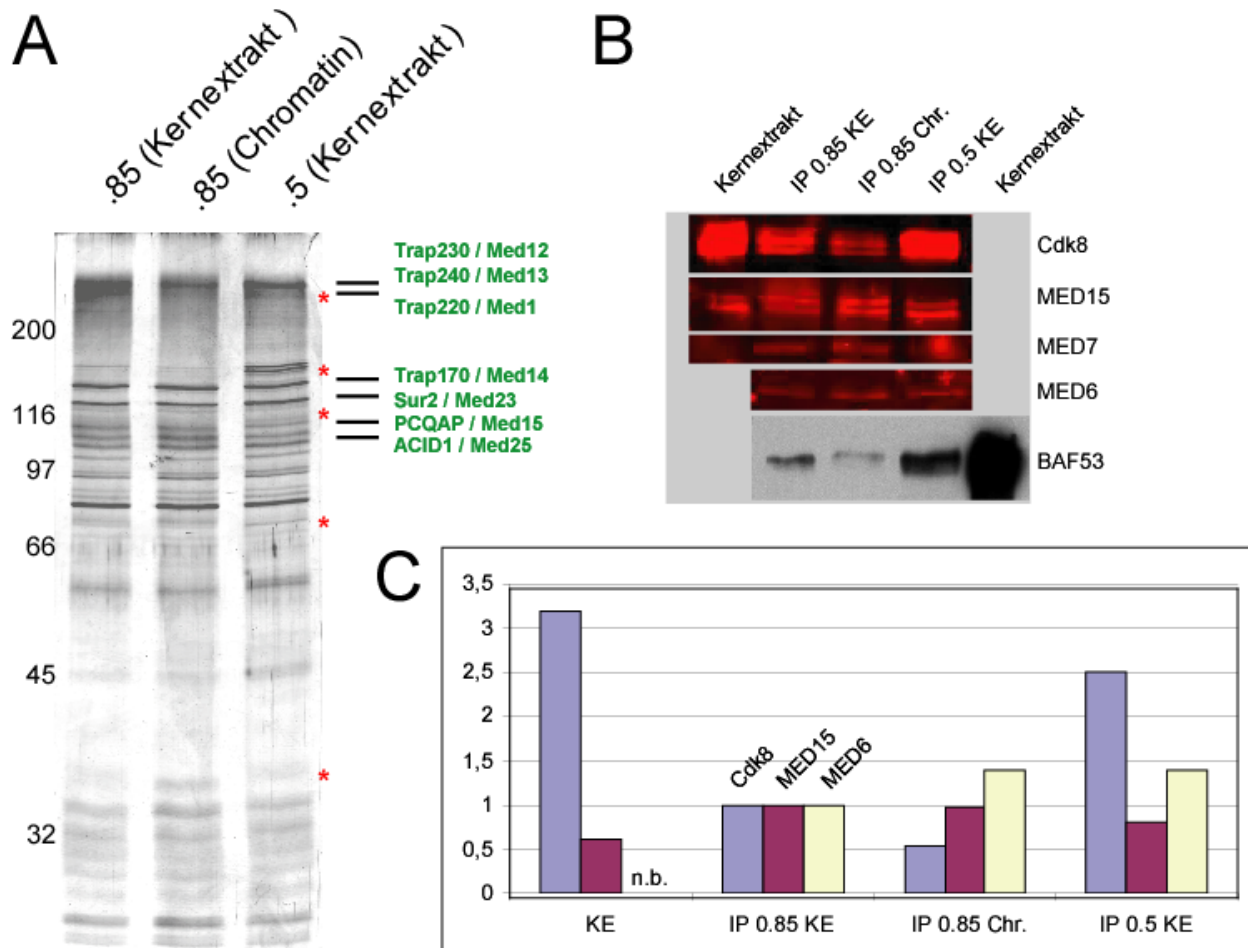
Die Mediator-Komplexe aus den verschiedenen P11-Fraktionen zeigten funktionale Unterschiede, sowohl in früheren Untersuchungen als auch in den Experimenten dieser Arbeit. Mediator-Komplexe aus Chromatinextrakten wurden bis dahin noch überhaupt nicht untersucht. Um Unterschiede in der Komposition zu ermitteln und eine Verbindung zu den bekannten Funktionen herzustellen, wurden daher Immunpräzipitationen in den 0.5- und 0.85-Fraktionen des Kernextraktes und in der 0.85-Fraktion des Chromatinextraktes durchgeführt.

Es wurde der MED15-Antikörper 6C9 verwendet. Um Konzentrationsunterschiede auszugleichen, wurden die 0.85-Fraktion aus Kern- und Chromatinextrakt um den Faktor 2.5 bzw. 5 aufkonzentriert und im gleichen Volumen wie die 0.5-Fraktion eingesetzt. Dies führte zur Aufreinigung vergleichbarer Mengen Mediator-Komplex. Die Aufreinigung einschließlich der Waschschrte wurde bei der Ionenstärke der jeweiligen Fraktion (0.5 bzw. 0.85 M KCl) durchgeführt.

Die Analyse in der Gesamtproteinfärbung zeigt mehrere differentielle Banden, die den Mediator aus der 0.5-Fraktion, die Komplexe aus beiden 0.85-Fraktionen bzw. den Komplex aus der 0.85-Chromatinfraktion spezifisch kennzeichnen (Abbildung 3-19).

Mit dem Licor-Odyssey-System lassen sich Proteine auf Western Blot Membranen quantifizieren. Es wurde genutzt, um das Verhältnis verschiedener Mediator-Untereinheiten zueinander und insbesondere den Gehalt an Cdk8 zu ermitteln. Die Auftragung der Zahlenwerte im Diagramm zeigt anhand der konstitutiven Untereinheiten MED15 und MED6, daß vergleichbare Mengen Mediator aufgereinigt wurden. Cdk8 ist im Mediator der 0.85-Kernextraktfraktion unterrepräsentiert und im Chromatin offenbar noch weiter abgereichert.

Der Gehalt der SWI/SNF-Untereinheit BAF53 variiert, doch dieser Unterschied könnte durch die unterschiedlichen Ionenstärken in der Aufreinigung bedingt sein. Eine spezifische Bindung ausschließlich des B-MED-Komplexes an SWI/SNF läßt sich aber nach diesem Ergebnis verneinen.



**Abbildung 3-19: Mediator-Komplexe aus verschiedenen Phosphocellulose-Fractionen.**

Mediator-Komplex wurde aus den verschiedenen p11-Fractionen 0.85 und 0.5 aus Kernextrakt und 0.85 aus Chromatinextrakt mit dem MED15-Antikörper 6C9 immunpräzipitiert. (A) Gesamtproteinfärbung. Differentielle Banden sind gekennzeichnet (\*). (B) Western Blots der Aufreinigung aus Bild A mittels ECL bzw. dem Licor Odyssey-System. Während die konstitutiven Mediator-Untereinheiten in vergleichbarer Menge auftreten, ist Cdk8 im Mediator aus der 0.5 Fraction sehr deutlich überrepräsentiert, ebenso wie die offenbar assoziierte SWI/SNF-Untereinheit BAF53.

(C) Die Intensitäten im Western Blot relativ zum Mediator aus der Kernextrakt-0.85-Fraktion sind im Diagramm dargestellt.

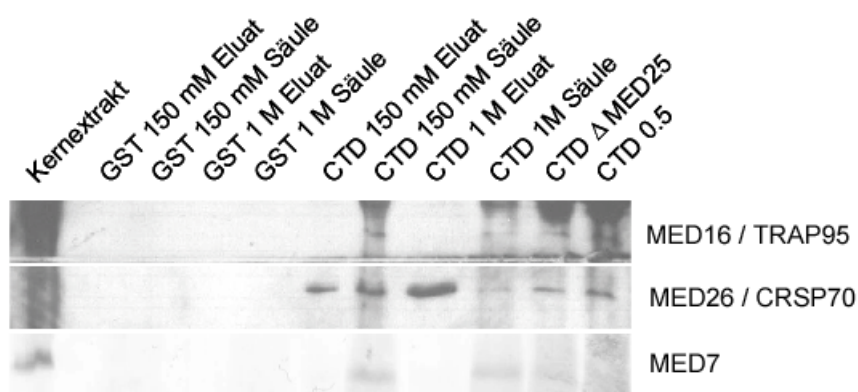
### 3.4.7 Mediator-Bindung an die RNA Polymerase II C-terminale Domäne ist unabhängig von MED26 / CRSP70

B-MED/CRSP bindet spezifisch an die Pol-II-CTD und läßt sich über das entsprechende GST-Fusionsprotein aufreinigen. In der vorliegenden Arbeit ist dieser CTD-bindende Komplex bisher nur funktional beurteilt und die Komposition noch nicht bestimmt worden. Es muß aber eine Besonderheit geben, die die Bindung an die CTD ermöglicht. Neben der Abwesenheit des Cdk8-Moduls könnte es die Anwesenheit von MED26/CRSP70 sein, die in der Literatur beschrieben wurde (Naar et al. 2002). Außerdem enthielt der von G. Mittler, Abt. Genexpression, GSF München beschriebene B-MED kein MED16/TRAP95.

Die Aufreinigung des Mediators über GST-CTD ist relativ ineffizient und führte nicht zu einem auszuwertenden Bandenmuster in der Gesamtproteinfärbung. Außerdem wurde im Western Blot ein Verlust der Untereinheit MED26/CRSP70 bemerkt. Dieses Phänomen in Abhängigkeit von der Ionenstärke in Lösung wurde näher untersucht. Bereits bei 150 mM KCl wird ein Anteil des MED26 vom Mediator dissoziiert, bei 1 M KCl wird die Bindung vollständig aufgehoben. Die Bindung von B-MED/CRSP an CTD bleibt indes erhalten. Ebenso ist MED16 mit dem CTD-gereinigten B-MED assoziiert.

Eine vorherige Depletion des Extraktes mit dem MED25-Antikörper bewirkt, daß auf der CTD-Säule die Mengen sowohl an Mediator als auch MED26 abnehmen.

Mittels GST-CTD ließ sich eine geringe Menge Mediator-Komplex bzw. MED26 auch aus der P11-0.5-Fraktion isolieren.



**Abbildung 3-20: Assoziation von Mediator / MED26 / MED16 mit GST-CTD.**

B-MED / CRSP wurde aus HeLa-Kernextrakt an eine CTD-Säule gebunden, gewaschen und eine Stunde mit BC150 oder BC1000 inkubiert. Die Eluate und die auf der CTD-Säule verbliebenen Proteine sind aufgetragen. MED26 dissoziiert bereits bei 150 mM KCl.

Des weiteren wurden Aufreinigungen mit GST-CTD in MED25-depletierten Extrakt und in der P11 0.5-Fraktion durchgeführt. Im Western Blot wurde der Gehalt an gebundenen Mediator-Untereinheiten überprüft.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zellfraktionierung

Zellfraktionierungen werden zu analytischen und präparativen Zwecken durchgeführt. Die in dieser Arbeit entwickelten und verwendeten Protokolle erfüllten die Anforderungen an präparative Methoden. In keiner der Aufreinigungen aus Zellkernextrakt, beispielsweise des Mediator-Komplexe, traten unerwünschte cytoplasmatische Proteine auf. Die Auftrennungen in Cytoplasma, Kernextrakt und Chromatinextrakt waren sinnvoll, da distinkte Fraktionen erhalten wurden, deren Charakteristika teilweise auch bei Verwendung anderer Zelllinien erhalten blieben.

Die dabei erreichbare Trennschärfe ließ sich an einzelnen Proteinen beobachten, die sich vollständig in einer Fraktion befanden. Andere Proteine wiederum traten in allen drei Fraktionen auf. Dieses Phänomen kann z.T. auch durch die Vorgänge in der Zelle selbst erklärt werden, etwa durch regulierten Zellkernimport. Des weiteren befinden sich manche Proteine des Cytoskeletts auch im Zellkern, z.B. Aktin (Bettinger et al. 2004). Immerhin befindet sich zwischen Cytoplasma und Nukleoplasma eine stabile Membran und beide Kompartimente sind über definierte Transportmechanismen verknüpft. Dagegen ist die Auftrennung in lösliche Kernproteine und Chromatinproteine und insbesondere ihre Validierung deutlich anspruchsvoller. Beispielsweise sind mit Ausnahme der Histone alle in dieser Arbeit erwähnten Kernproteine und Kernproteinkomplexe aus Extrakten der löslichen Kernproteine zu extrahieren, während sie ihre eigentliche Funktion im Chromatin ausüben. Zum Teil werden diese Proteine auch *in vivo* überhaupt nur zeitweilig mit dem Chromatin assoziiert sein und zum Teil werden sie durch die Extraktionsbedingungen unter hohen Ionenstärken frühzeitig von den Nukleinsäuren dissoziiert werden. Der Grad der Überschneidung zwischen einzelnen Fraktionen kann daher bei einer etwaigen Herstellung zusätzlicher Fraktionen aus Zellkernen und Chromatin nur zunehmen.

Die teils vorläufigen Resultate dieser Arbeit machen hingegen einen Bedarf an analytischen Extraktionsmethoden und insbesondere ihrer Validierung deutlich. So wurden Proteine mit Kernlokalisationssignal in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert. Es ist zwar wahrscheinlich, daß diese Proteine - eventuell signalabhängig - tatsächlich im Cytoplasma lokalisiert sind, aber der Beweis steht noch aus.

Auf der Ebene der Zellfraktionierung müßte hierbei ausgeschlossen werden, daß eine eventuelle Extraktion von diesen und anderen Kernproteinen bereits vorzeitig bei den niedrigen Ionenstärken der hypotonischen Lyse auftritt.

Außerdem wurde beobachtet, daß sich MED25/ACID1 sowie der B-MED-Komplex relativ zu anderen Zellkernproteine bevorzugt im Chromatin befinden. In beiden Fällen würde diese Erkenntnis neue Aussagen über Funktionsmechanismen ermöglichen, doch ist eine Beweisführung allein über die Zellfraktionierung sehr schwierig. Neben der Entwicklung alternativer Nachweismethoden könnten Zellfraktionierungsprotokolle angewandt werden, die über einen limitierenden Nukleaseabbau der DNA spezifisch Proteine des transkriptionsaktiven Chromatins (Euchromatin) anreichern (Beispiele in Huang und Garrard 1989, Rose und Garrard 1984, Tikoo et al. 1997). Auf diese Weise wurde z.B. eine bevorzugt Assoziation des SWI/SNF-Komplexes mit dem Euchromatin beschrieben (Reyes et al. 1997).

## **4.2 Motivspezifische Antikörper**

### **4.2.1 Herstellung von Motivantikörpern**

Bei der Herstellung von Motivantikörpern zur Detektion und Aufreinigung von Proteinsubpopulationen wurde ursprünglich damit gerechnet, daß „selbstreaktive“ B-Zellen einer negativen Selektion unterliegen (Nossal 1994) und daher Antikörper gegen hochkonservierte Motive aus diesem Grund schwer zu generieren sind. Gegen diese Annahme spricht, daß relativ erfolgreich Motivantikörper gegen einfache Polyaminosäure-Motive erzeugt wurden. So wurden Antikörper gegen Polyprolin- und negativ geladene Bereiche von Proteinen erhalten. Polyprolin-Sequenzen, gegen die zahlreiche Klone generiert wurden, sind eine häufiges Motiv im Proteom aller Lebewesen.

Schwieriger ist es offenbar, Antikörper gegen komplexe Motive zu generieren. Der Antikörper (9C2), der gegen das ATP-bindende Motiv der Kinasen gerichtet ist, bindet neben dem Immunogen auch andere glycinreiche Sequenzen. Weitere Immunisierungen mit komplexen Motiven verliefen erfolglos. In Anbetracht der Anforderungen, die an einen Motivantikörper gestellt werden ist dies nicht völlig überraschend. Bei der Immunisierung mit einem längeren Fusionsprotein, aber auch bei Peptiden als Immunogen bieten sich dem Immunsystem eine nahezu unbegrenzte Zahl von verschiedenen Epitopen. Dennoch werden häufig mehrere Immunisierungen bzw. mehrere Tiere und Fusionen gebraucht, um einen monoklonalen Antikörper

gegen ein spezifisches Protein zu entwickeln. Im Falle der Motivantikörper ist das Epitop aber über die Konsensussequenz bereits vordefiniert. Entsprechend schwierig bzw. arbeitsintensiv ist es, einen B-Zell-Klon/eine Hybridom-Zelle zu finden, die exakt diese Spezifität aufweist. Einen alternativen Weg, der dieses Problem umgeht, hat die Firma Cell Signaling Technology, Beverly, USA aufgezeigt (Zhang et al. 2002). Es wurden polyklonale Antikörper gegen die Phosphorylierungsstellen der Kinasen PKC (SxR) und Akt (RxRxxT/S) generiert. Dabei wurden entsprechend permutierte Peptidbibliotheken zur Immunisierung und danach zur Isolierung der Antikörper in der Affinitätschromatographie und zur Spezifitätskontrolle verwendet. Dieser Ansatz war sehr erfolgreich, ist aber mit Nachteilen behaftet. So ist der Herstellungsprozess der Antikörper aufwendig und damit teuer. Der „Antikörpercocktail“ ist nur in begrenzten Mengen verfügbar und einzelne Chargen werden sich zwangsläufig voneinander unterscheiden. Die Vorgehensweise eignet sich daher eher für ein kommerzielles Produkt.

Der leistungsfähigste Klon der Polyprolin-Antikörper (9A9) sowie der einzige verwendbare Klon gegen saure Motive (2G6) gehörten zur IgM-Subklasse. IgM-Antikörper liegen als Pentamer vor und können multiple Epitope kooperativ binden. Dieses Phänomen wird als Avidität bezeichnet. Es ist vorstellbar, daß auf Western-Blot-Membranen die Epitope dicht beieinander liegen und Aviditätseffekte das Signal verstärken. Auch enthalten die entsprechenden Proteine oft mehrere Polyprolin-Bereiche. Insbesondere bei den Poly-(Glu/Asp)-Motiven ist es möglich, daß die multiplen Valenzen des IgM-Antikörpers eine detektierbare Interaktion erst ermöglichen. Damit wäre erklärbar, warum der Antikörper in der Immunpräzipitation, in der isolierte Interaktionen zu den Proteinen in Lösung auftreten, nicht verwendbar war.

#### **4.2.2 Einsatz der Motivantikörper in vergleichender Proteomics**

Die Motivantikörper wurden im Wesentlichen zur Detektion differentiell exprimierter Proteine entwickelt. Jeder der Antikörper konnte in den verwendeten Modellsystemen solche signalabhängigen Veränderungen detektieren.

Weiterhin können die Motivantikörper bei geringem experimentellen Aufwand ein Bild über die Proteinviefalt in der Zelle vermitteln. Es ist zu beobachten, daß transformierte Zellen ein wesentlich größeres Spektrum an Poly-(D/E)-Proteinen exprimieren als primäre T-Zellen auch nach der Aktivierung. Das Überraschende dabei ist, daß das komplizierte Bandenmuster dabei vor allen Dingen den transformierten



Phänotyp kennzeichnet und die Unterschiede zwischen den Gewebetypen optisch in den Hintergrund treten. Dabei sind Aufgrund der Zelldifferenzierung größte Unterschiede zwischen T-Lymphocyten und den morphologisch und funktional distinkten Nierenzellen zu erwarten. Daß das Gegenteil der Fall ist, läßt den Schluß zu, daß die Dedifferenzierung und regulative Desorganisation dieser Krebszelllinien bereits weit fortgeschritten ist. Aus den Mustern im Western Blot könnten gezielt diagnostische Marker abgeleitet werden, die den transformierten Phänotyp kennzeichnen.

Neben der Isolation transformierter Zellen aus Menschen und Tieren ist die Gewinnung von Zelllinien über experimentelle Immortalisierung möglich, beispielsweise durch Sequenzen von SV40 (Übersicht in Bryan und Reddel 1994).

Das Ziel ist dabei, eine Zelllinie zu gewinnen, die den primären Zellen sehr nahekommt, aber dennoch unbegrenzt in Kultur zu halten ist. Dies kann eine Voraussetzung für umfassende proteinbiochemische Studien sein. Motivantikörper könnten einen Beitrag leisten, solche Modellsysteme zu validieren, indem sie die "Verwandtschaftsbeziehungen" zu primären bzw. dedifferenzierten, transformierten Zellen aufklären.

#### 4.2.3 Polyprolin als Protein-Protein-Interaktionsmotiv

Mit dem Polyprolin-Antikörper 9E11 konnten mehrere der Proteine mit diesem Motiv aus Kernextrakt gereinigt und identifiziert werden. Die vielfältigen Interaktionen, die diese Proteine eingehen können sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Eine genaue Betrachtung dieser fünf Polypeptide zeigt, daß in mindestens vier davon das Polyprolin-Motiv als Ligand für interagierende Proteine dient. Drei dieser Proteine (FBP30, MENA und N-WASP) enthalten wiederum Domänen, die Polyprolin-Motive in anderen Proteinen binden können. Die Interaktionen werden von den bekannten Polyprolin-Interaktionsdomänen EVH1, WW und SH3 vermittelt (Zarrinpar et al. 2003). Außerdem bindet das Protein Profilin solche Motive. Manche der WW-Domänen, sogenannte Typ II/III-WW-Domänen, binden sogar einfache Prolin-Polymere (Kato et al. 2004). In Tabelle 4.1 betrifft dies die Proteine FBP30, FBP11 und Fe65.

Offenbar sind Polyprolin-Motive simple Interaktionsdomänen, die eine Vielzahl von Protein-Protein-Wechselwirkungen funktional interessanter Polypeptide vermitteln können. Aufgrund ihrer Abundanz wurden vor allen Dingen Proteine aufgereinigt, die die (Re-)organisation des Aktin-Cytoskeletts bewirken können. Doch gibt es

Polyprolin-Proteine, die in der transkriptionellen Regulation eine Rolle spielen, so z.B. die Histonmethyltransferasen KIAA0339/hSET1 und Dot1, den Transkriptionsfaktor HoxB4 und das virale Protein EBNA-2 (s. Anhang).

Formin binding protein 4 (FBP30, FNBP4)				
↗?	WW	HYP4		Aktin-Cytoskelett
↘	WW	Formin	Chan et al. 1996	
Diaphanous-related formin 1 (Dia1)				
↗	SH3	WISH	Satoh und Tominaga 2001	Aktin-Cytoskelett
↗		Profilin	Watanabe et al. 1997	
Splicing factor 1 (SF1, ZNF162)				
↗	WW	CA150	Goldstrohm et al. 2001	Transkription/Elongation/Spleißen
↗	WW	FBP11	Lin et al. 2004	
↗	WW	FBP21	Bedford et al. 1998	
MENA (Drosophila Enabled homolog)				
↗	WW	Fe65	Ermekova et al. 1997	Bindet beta-Amyloid-Vorläuferprotein
↗		Profilin	Gertler et al. 1996	Aktin-Cytoskelett
↘	EVH1	ActA	Niebuhr et al. 1997	<i>Listeria monocytogenes</i> ActA-Protein
↘	EVH1	Abi1	Tani et al. 2003	c-abl Signaltransduktion
WASL, N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein)				
↗	SH3	Toca-1	Ho et al. 2004	Aktin-Cytoskelett
↗	SH3	WISH	Fukuoka et al. 2001	
↘	EVH1	WIP	Volkman et al. 2002	

**Tabelle 4.1 : Polyprolin-vermittelte Interaktionen zwischen den immunpräzipitierten Polyprolin-Proteinen und assoziierten Faktoren.** Für jedes der fünf identifizierten Proteine sind die jeweiligen Interaktoren, die mit einem Polyprolin-Motiv interagierende Domäne und die Richtung der Interaktion (↗/↘) angegeben. Zudem sind Literaturstellen und die entsprechenden zelluläre Prozesse genannt.

### 4.3 Kernproteinfärbung mit Importin $\alpha$

Ähnlich den Motivantikörpern läßt sich auch die Kernproteinfärbung mittels Importin  $\alpha$  dazu verwenden, signalabhängige Vorgänge in der Zelle zu erfassen. Auf einem 2D-Gel lassen sich hunderte von Kernproteinen gleichzeitig beobachten. Die erreichbare Sensitivität ist im Western Blot etwa um eine Größenordnung höher als bei der Silberfärbung, was offenbar in vergleichbarer Weise für den Far-Western-Blot mit Importin  $\alpha$  gilt.

In Abwesenheit sensitiverer Detektionsmethoden für Proteine kann die Methode daher Veränderungen in Zellen aufzeigen, die alternativ nur noch mit spezifischen Antikörpern gegen jedes der Proteine nachgewiesen werden könnten.

Die Beschränkung auf das Subproteom der NLS-tragenden Kernproteine hat dabei sowohl Vor- als auch Nachteile, wird doch das Signal cytoplasmatischer Proteine und eines Teils der Kernproteine regelmäßig ausgeblendet. Beispielsweise befindet sich das hochabundante Cytoskelettprotein Aktin in beiden Kompartimenten der Zelle, lieferte aber aufgrund fehlender NLS kein Signal. Ein wichtiger Teil des regulatorischen Proteoms der Zelle befindet sich jedoch im Zellkern und kann spezifisch betrachtet werden, ohne daß eine Zellfraktionierung notwendig wäre.

Die Far-Western-Blot-Methode ermöglicht zudem erstmals die gezielte Betrachtung cytoplasmatischer Proteine mit Kernlokalisationssequenzen. Diese Proteine werden dem regulierten Kernimport/-export unterliegen und sind daher gute Kandidaten für eine signalabhängige Regulation (Übersicht in Jans et al. 2000, Yoneda 2000).

Die in dieser Arbeit entwickelten Kontrollen der Methode bieten über ihren ursprünglichen Zweck hinaus die Möglichkeit, die Zahl der detektierbaren Proteine spezifisch einzuschränken. Die chemischen Modifikation von Aminosäuren ermöglicht die Untersuchung von Proteinen deren NLS ausschließlich aus entweder Lysin- oder Arginin-Resten besteht. Die N-terminale Deletion der NLS-Bindestelle bewirkt ebenfalls eine Reduktion des Musters auf wenige Banden. Es könnte sich hierbei um Proteine handeln, die wie z.B. die Transkriptionsfaktoren STAT1/2 eine nicht-klassische NLS besitzen (Melen et al. 2003).

Insbesondere bei den nicht-klassischen NLS werden Unterschiede zwischen den sechs Importin- $\alpha$ -Paralogen auftreten, während bei den klassischen NLS weitreichende Überlappungen des Bindungsspektrums zu erwarten sind (Jans et al. 2000), zumal auf den Western-Blot-Membranen keine Konkurrenz zwischen NLS-Proteinen auftreten wird. Falls erforderlich, könnten die Paraloge nach dem gleichen Schema durch Deletion dereprimiert werden.

Ähnlich den Motivantikörpern kann auch GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N zur Aufreinigung seiner Interaktionspartner verwendet werden. Es treten hierbei deutliche Konkurrenzeffekte auf, und es kommt zur Anreicherung mancher Proteinspezies. Es ist anzunehmen, daß diese Proteine –dek und PARP1 (Schreiber et al. 1992)- sehr effiziente NLS besitzen (s. 3.3.3), die beispielsweise in Expressionsvektoren eingesetzt werden könnten.

Außerdem könnten mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N heterolog in *E. coli* exprimierte Zellkernproteine ohne fusionierten *Tag* aufgereinigt werden.

Die vorgestellte Methode ist ein Beispiel dafür, wie Protein-Protein-Interaktionsdomänen erfolgreich für die Detektion von Proteinsubpopulationen eingesetzt werden können. Dies wird aufgrund geringerer Bindungsaffinitäten nicht

mit jedem Protein möglich sein. Eventuell könnten Aviditätseffekte durch Homomultimerisierung der Domäne ausgenutzt werden. Es ist anzunehmen, daß diese bereits mit dem in dieser Arbeit genutzten dimeren GST-Fusionsprotein auftreten (Tudyka und Skerra 1997). Die Verwendung einer Tetramerisierungsdomäne z.B. aus p53 könnte die Affinität/Avidität für den Liganden noch einmal erheblich steigern (Rheinnecker et al. 1996)

#### **4.4 Proteinexpression in der T-Zell-Aktivierung**

Mit dem Importin- $\alpha$ -Fusionsprotein konnte eine erhebliche Umorganisation des Zellkernproteoms während der T-Zell-Aktivierung beobachtet werden. Die Vielfalt NLS-tragender Kernproteine und ihre Gesamtmenge relativ zu Strukturproteinen wie Aktin stieg deutlich an. Diese Veränderungen lassen sich offenbar nicht allein auf transkriptionelle Regulation zurückführen, die in der T-Zell-Aktivierung bei Zunahme der globalen Transkriptionsaktivität das Spektrum, aber nicht die Anzahl der transkribierten Gene verändert (Teague et al. 1999). Die T-Zell-Aktivierung bewirkt daneben auch eine Steigerung der rRNA-Synthese, der Translationsaktivität, sowie die translationale Regulation eines Teils der Gene (Cooke und Kay 1973, Mikulits et al. 2000, Miyamoto et al. 2000). Die erhöhte Proteinsynthese beinhaltet auch eine erhebliche Überexpression des Importin- $\alpha$ -2-Proteins (Andrade et al. 2003). Es ist wahrscheinlich, daß dies auch für die in dieser Arbeit verwendete Isoform Importin- $\alpha$ -1 gilt. Auch ist eine verstärkte Kernimportaktivität des Importin- $\alpha$ -2 anhand der subzellulären Lokalisation zu beobachten.

Aufgrund der vielschichtigen Regulationsmöglichkeiten ist es schwierig, die Beobachtungen in dieser Arbeit an eine isolierten Ursache zu knüpfen. Das Beispiel illustriert aber sehr deutlich den Unterschied zwischen mRNA- und Proteinabundanzen und es ist ein gutes Argument für die gezielte Betrachtung des Proteoms mit den hier vorgestellten oder anderen Methoden.

#### **4.5 Untersuchungen an humanen Mediator-Komplexen**

Aufgrund seiner elementaren Bedeutung in der Transkriptionsinitiation war der Mediator-Komplex in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Doch sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch viele grundlegende Fragen offen.

So ist es ungeklärt, ob der Komplex eine Aufgabe besitzt, die über eine Brückenfunktion zwischen Aktivatoren, GTFs und Pol II hinausgeht. In jedem Fall ist die Primärstruktur im Gegensatz zu anderen Komponenten des

Präinitiationskomplexes (PIC) großen Veränderungen in der Evolution unterworfen gewesen. Zudem gibt es sieben metazoenspezifische Untereinheiten, die ähnlich den meisten konstitutiven Untereinheiten zwischen *D. melanogaster* und *H. sapiens* nur schwach konserviert sind (Übersicht in Blazek et al. 2005, s. Anhang). Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß in der Evolution die Konservierung von Interaktionsflächen zwischen den Untereinheiten und zur transkriptionellen Maschinerie, nicht aber der Erhalt komplexer Mechanismen eine Rolle gespielt hat.

#### 4.5.1 Mediator und transkriptionelle Synergie

In der Literatur wurden mehrfach Synergieeffekte zwischen Aktivatoren beschrieben, die offenbar nicht auf der direkten Interaktion dieser Proteine, sondern vielmehr auf der jeweiligen Interaktion mit DNA und Komponenten der Transkriptionsmaschine beruhten (frühes Beispiel in Lin et al. 1990). Durch kooperative Bindung und damit einhergehende Aviditätseffekte (ähnlich der Bindung multivalenter Antikörper) wird der Aufbau des PIC stabilisiert.

Im Lauf der Zeit wurden komplexere Modelle entwickelt, die die Bedeutung eines Interaktionsnetzwerkes unterstreichen (Lehman et al. 1998, Wang et al. 1999). Die freie Enthalpie des PIC-Aufbaus und damit die Stabilität wird demnach durch die einzelnen Beiträge einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Aktivatoren, Coaktivatoren, DNA, GTFs und Pol II bestimmt.

Auf diese Weise trägt jede Komponente des PIC, die mehr als eine Interaktion eingehen kann, zum dessen Aufbau und Stabilisierung bei.

Insbesondere wird dies für den Mediator-Komplex gelten. Neben den Kontakten zu einer großen Zahl von Aktivatoren kann der Mediator RNA Polymerase II binden. Die Aufreinigungen des Mediator-Komplexes in dieser Arbeit zeigen, daß dies offenbar die stabilste Interaktion mit Komponenten des PIC ist. Darüber hinaus gibt es Indizien für direkte Interaktionen mit TFIID, TFIIF und TFIIE (Yudkovsky et al. 2000, Johnson et al. 2002). Bisher konnte zumindest im humanen System noch nicht demonstriert werden, daß diese Wechselwirkungen auch in Lösung auftreten, so daß sie jeweils für sich genommen sehr schwach sein werden. Dennoch könnten sie sich im Kontext des PIC gegenseitig stabilisieren. Es ist beispielsweise gezeigt worden, daß Mediator mit einem Aktivator, TFIID und TFIIF einen stabilen Komplex an einem Promotor bilden kann (Johnson et al. 2002, Johnson und Carey 2003). Auf den Aktivator konnte sogar verzichtet werden, wenn ein Überschuß der anderen drei Komponenten eingesetzt wurde. Die Transkriptionsraten waren vergleichbar und damit

unabhängig von den Eigenschaften des Aktivators. Dies könnte auch eine Erklärung für die Effekte des Mediators in basaler Transkription liefern. Der Mediator muß hierbei durch die Komponenten des PIC rekrutiert werden. Es ist unwahrscheinlich, daß Mediator hierbei ausschließlich mit der RNA Polymerase II interagiert, denn Mediator und TFIIF können offenbar nicht gleichzeitig an Pol II binden (Rani et al. 2004). Sollte aber der Mediator Komplex mehrere Komponenten binden und dabei keinen Faktor verdrängen, wird er zwangsläufig den Aufbau des PIC stabilisieren. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Interaktion zwischen Mediator und Aktivator dem Interaktionsnetzwerk nur eine weitere stabile Bindung hinzufügt und allein damit die Unterschiede zwischen Raten basaler und aktivierter Transkription begründet.

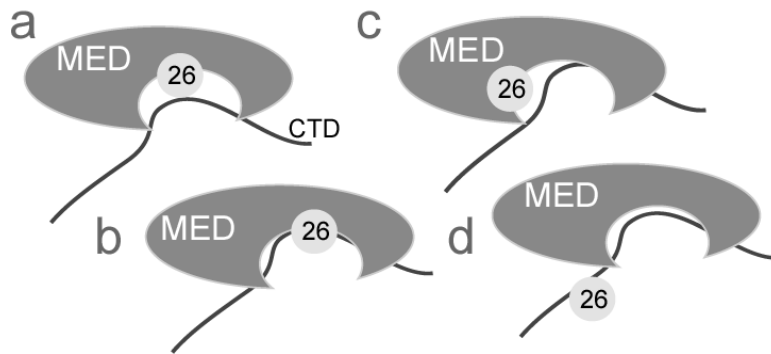
In dieser Arbeit wurde die basale Aktivität des über die Pol-II-CTD gereinigten CRSP-Komplexes und damit die Identität zwischen B-MED und dem Coaktivator CRSP demonstriert. Somit gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt wenig Gründe funktional oder biochemisch zwischen basalen und Coaktivatorfunktionen des Mediators zu unterscheiden.

#### 4.5.2 Mediator-Interaktionen mit RNA Polymerase II

Bei beiden Funktionen des Mediators wird die stabile Interaktion mit der RNA Polymerase II eine entscheidende Rolle spielen. Trotz etlicher Erwähnungen in der Literatur ist diese noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Bindung an die C-terminale Domäne (CTD) der Pol II ist bisher am besten untermauert. Viele dieser Daten stammen aus *S. cerevisiae* (Thompson et al. 1993, Kim et al. 1994, Myers et al. 1998). Sowohl in Hefe als auch im humanen System wurde demonstriert, daß sich die Bindung der CTD auf die „kleinen“ Mediator-Komplexe ohne Kinase-Submodul beschränkt (Myers et al. 1998, Naar et al. 2002), welches durch die Experimente dieser Arbeit weitere Bestätigung erfährt. Unklar ist dabei die Rolle der Untereinheit MED26/CRSP70, die regelmäßig mit den „kleinen“ Komplexen assoziiert ist.

Obwohl sie mehrfach als CTD-interagierende Untereinheit postuliert wurde (zuletzt in Sato et al. 2004), ergaben die Experimente dieser Arbeit, daß die Interaktion Mediator-CTD auch nach Dissoziation von MED26 bestehen blieb. Auch wird die Assoziation von MED26 mit der CTD durch Depletion des Mediators verringert, so daß eine Mediator-unabhängige Assoziation mit der CTD ausgeschlossen werden kann.

Viel wahrscheinlicher ist, daß nach Dissoziation des Kinase-Moduls MED26 sich an die freigelegte CTD-bindende Domäne anlagert, die Assoziation mit Pol II aber nicht wesentlich beeinflußt.



**Abbildung 4-1: Annahmen über die Assoziation von MED26/CRSP70 mit Mediator und Pol-II-CTD.** MED26 könnte spezifisch an den Komplex aus CTD und Mediator binden (b) oder könnte unabhängig von der CTD eine Position sehr nahe der CTD-Bindungsstelle einnehmen (c). Die Möglichkeiten, daß MED26 selbst den Kontakt zwischen Mediator und CTD herstellt (a) oder daß MED26 ein vom Mediator unabhängiges CTD-bindendes Protein darstellt (d), stehen dagegen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Gibt es darüber hinaus weitere CTD-unabhängige Interaktionen zwischen Mediator und Pol II? Aufgrund der mehr-als-additiven Effekte multipler Interaktionen könnte die Beantwortung dieser Frage entscheidende mechanistische Informationen über die „kleinen“ Mediator-Komplexe vermitteln. Außerdem könnte eine alternative Interaktionsfläche, die sich auch in Mediator-Komplexen mit Kinase-Modul befindet, deren Aufgabe in transkriptioneller Regulation aufklären helfen. Elektronenmikroskopische Daten eines Komplexes aus *S.-cerevisiae*-Mediator und Pol II lassen eine solche zweite Kontaktstelle neben der CTD vermuten (Asturias et al. 1999, Dotson et al. 2000, Davis et al. 2002). Von Mediator-Komplexen aus Säugetieren existieren solchen Daten noch nicht. Es ist aber eine Interaktion mit dem Cdk8-enthaltenden „großen“ Mediator-Komplex NAT mit CTD-freier Pol II beschrieben worden (Sun et al. 1998b). Die Experimente der vorliegenden Arbeit stützen ebenfalls die Existenz einer doppelten Interaktion mit RNA Polymerase II. Es wurde gezeigt, daß die CTD-Bindung durch 1000 mM KCl Ionenstärke nicht beeinträchtigt wird. Dagegen wird ein Großteil der Pol II bereits bei 400 mM vom Mediator dissoziiert. Dies wäre durch den beobachteten hohen Anteil (p11-Aufreinigung) des „großen“ Mediator-Komplexes zu erklären, der im Gegensatz zu B-MED/CRSP nur die alternative Bindungsstelle nutzen kann. Diese Eigenschaften sollen im nächsten Abschnitt in ein Modell integriert werden.

#### 4.5.3 Die Rolle des Kinase-Moduls in der Mediator-Funktion

Die Experimente dieser Arbeit zeigten, daß nur eine kleine Subpopulation der Mediator-Komplexe eine basale Funktion besitzt und das diese frei von Cdk8 ist. Mehrere in der Literatur beschriebene Untersuchungen konnten analog dazu eine Verbindung zwischen Cdk8-freien Komplexen und Coaktivator-Funktionen feststellen (Taatzjes et al. 2002, Malik et al. 2000b, Wu et al. 2003). Die „großen“ Komplexe wurde dagegen als transkriptionell inaktiv (Taatzjes et al. 2002) oder reprimierend (Sun et al. 1998a) beschrieben.

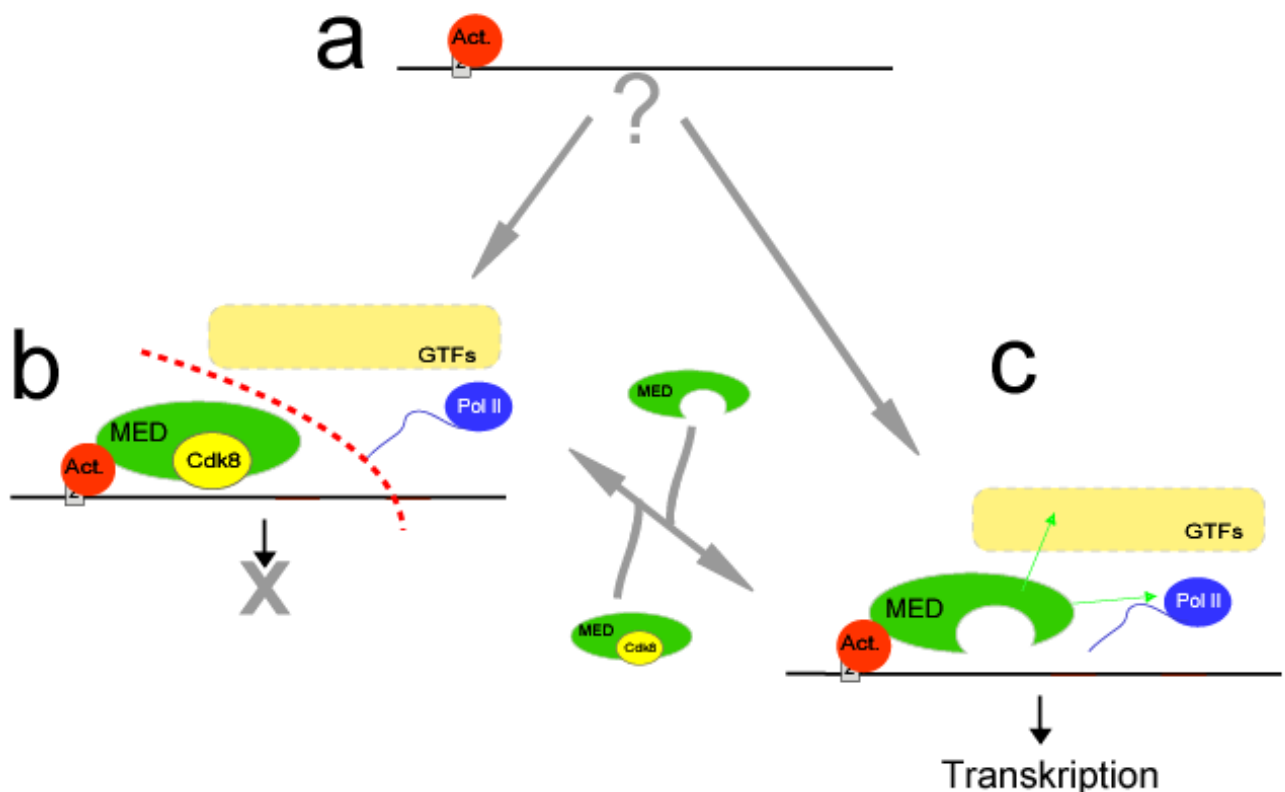
Die wichtigsten Aktivator-Bindungsstellen im Mediator-Komplex, MED1/TRAP220 und MED23/Sur2, sind Bestandteil fast aller bisher beschriebenen Mediator-Komplexe. Falls die klare funktionale Trennung zwischen aktiven und inaktiven Komplexen korrekt ist, müssen Aktivator und transkriptionelle Maschinerie bei identischer Aktivator-Mediator-Interaktion die Fähigkeit besitzen, spezifisch einen der Komplexe an den Promotor zu binden. In der Zelle mit zwei Kopien pro Gen ist dies von weit größerem Einfluß als im Experiment der *in-vitro*-Transkription, deren Ergebnis sich aus einer Vielzahl von Reaktionen zusammensetzt. Bisher ist dies erst für einen einzigen Transkriptionsfaktor - C/EBP $\beta$  im Ras-Signalweg- beschrieben, welcher in Abhängigkeit seines Aktivierungsstatus und im Einklang mit den o.g. Rollen der Komplexe spezifisch einen der beiden Komplexe binden kann (Mo et al. 2004). Die Beantwortung der Frage, ob hier ein Austausch oder eine Umwandlung stattfindet, könnte grundlegende Informationen über die Dynamik der Mediator-Komplexe vermitteln.

Es wurden in dieser Arbeit zwei Modelle aufgestellt, die die jeweiligen Möglichkeiten als generellen Mechanismus an eukaryotischen Promotoren illustrieren. Modell I geht von Komplexen mit unveränderlicher Komposition aus. Der Aktivator muß entweder durch bisher unbekannte Mechanismen in der Lage sein, spezifisch einen der Komplexe z.B. den „kleinen“, aktiven Mediator B-MED/CRSP zu rekrutieren, oder es gibt einen Mechanismus, der den Austausch von Mediator-Komplexen an Promotorregionen ermöglicht (Abbildung 4-2). Beide Mechanismen könnten auch in der Kombination existieren. Es ist möglich, daß weitere Aktivatoren, Cofaktoren, GTFs oder Pol II am Promotor eine Umgebung schaffen, die die Bindung eines der beiden Mediator-Komplexe favorisiert.



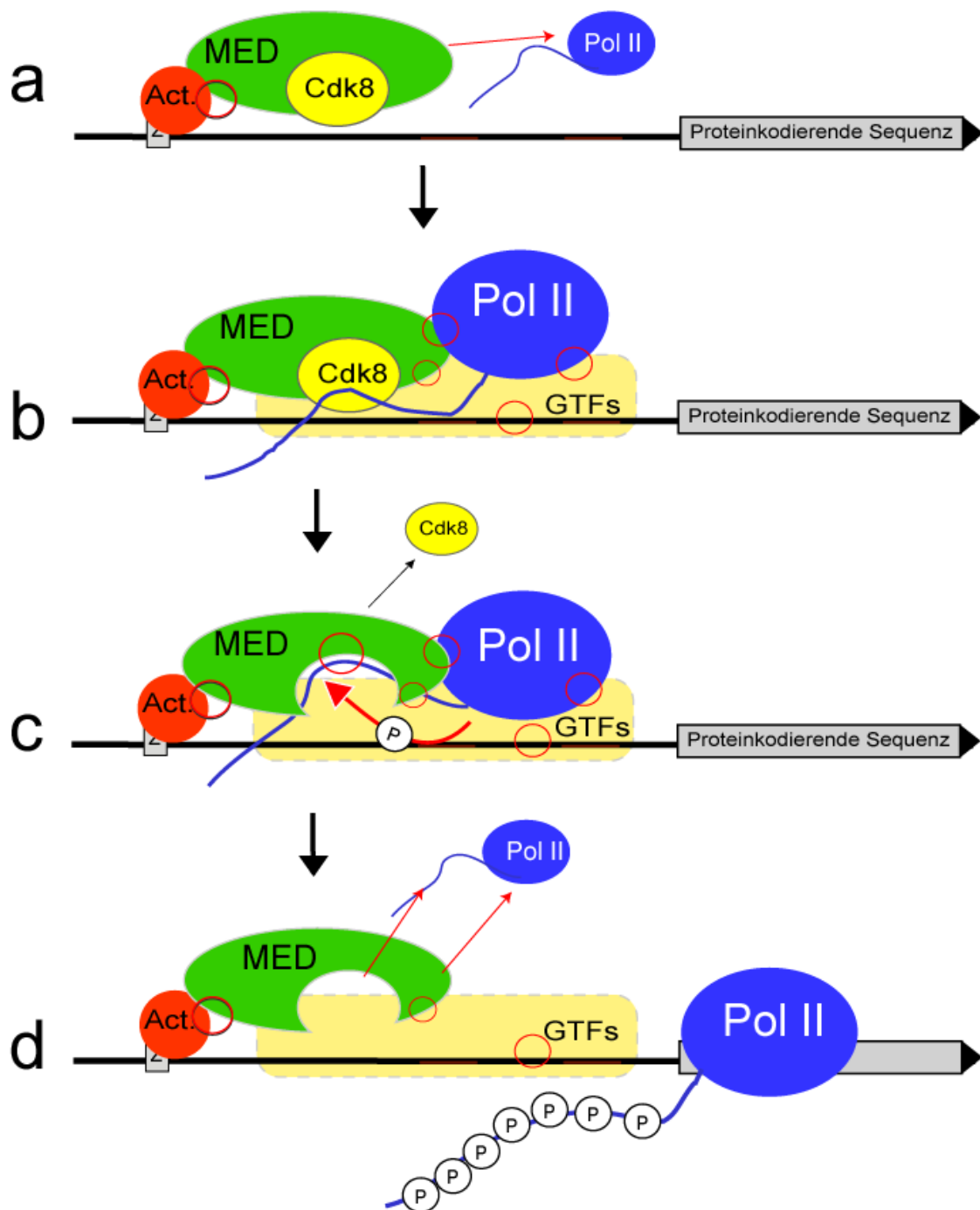
Daneben wäre es möglich, daß beispielsweise die „großen“ Mediator-Komplexe durch Dissoziation des Kinase-Moduls in B-MED/CRSP umgewandelt werden. Dies könnte aktivatorabhängig oder im Promotorkontext geschehen. Letztere Möglichkeit ist in Modell II illustriert (Abbildung 4.3).

In der Zelle liegt ein Überschuß an Pol II gegenüber Mediator vor. Dennoch besitzt ein Großteil des Mediators das Kinase-Modul, so daß eine Verdrängung durch die CTD in Lösung nicht wahrscheinlich ist. Am Promotor dagegen könnte die Freilegung der CTD-Bindungsstelle am Mediator den PIC erheblich stabilisieren. Konformationsänderungen des Mediators in Abhängigkeit von Aktivatoren und Komponenten der transkriptionellen Maschinerie könnten zusätzlich die Dissoziation des Kinase-Moduls begünstigen. B-MED/CRSP und die „großen“ Mediator-Komplexes wären dann Komponenten desselben Prozesses. Die geringe Menge an B-MED, die in der p11-Chromatographie dieser Arbeit gefunden wurde, würde dann einen induzierten, transkriptionsaktiven Zustand des Mediators analog elongierender Pol II darstellen.



**Abbildung 4-2: Hypothetisches Modell I: Austausch von Mediator-Komplexen am Promotor.**

Beide Arten von Mediator-Komplexen (MED) können (evtl. in Abhängigkeit eines unbekannten Regulationsmechanismus) durch Aktivatoren (Act.) an den Promotor rekrutiert werden. Während Mediator ohne Kinase-Modul (Cdk8) den Aufbau des PIC begünstigt, übt der größere Mediator-Komplex einen ausschließlich negativen Effekt auf die PIC-Bildung aus. Unbekannte Mechanismen ermöglichen einen Austausch vollständiger Komplexe am Promotor. Dieses Modell ist nicht widerlegt, aber es läßt derzeit viele Fragen offen.



**Abbildung 4-3: Hypothetisches Modell II: Verdrängung des Kinase-Moduls durch Pol-II-CTD.** Mediator einschließlich des Kinase-Moduls wird über einen Aktivator an den Promotor rekrutiert und kann über schwache Wechselwirkungen die Rekrutierung von Pol II und GTFs bewirken (a). Der Präinitiationskomplex einschließlich des Mediators wird über vielfältige Wechselwirkungen (rote Kreise) stabilisiert (b). In diesem Kontext ist es der C-terminalen Domäne der Pol II möglich, das Cdk8-Modul aus dem Mediator zu verdrängen. Der Mediator wechselt in diesem Fall von einem einer schwachen Interaktion mit Pol II zum CTD-Bindungsmodus, welcher den PIC weiter stabilisiert (c). Diese Interaktion wird via Phosphorylierung durch den GTF TFIIH wieder gelöst und die Pol II kann den Promotor verlassen (d). Weil die CTD-Bindestelle im Mediator erhalten geblieben ist, sind die Pol-II-Rekrutierung und die erneute Initiation am Scaffold-Komplex erheblich beschleunigt (d).

Dies würde auch bedeuten, daß sich B-MED/CRSP hauptsächlich an den Promotoren aktiv transkribierter Gene befindet. Die Ergebnisse der P11-Chromatographie in dieser Arbeit lieferten erste Anhaltspunkte dafür, daß B-MED/CRSP im Chromatin gegenüber den Mediatoren mit Kinase-Modul überrepräsentiert ist. Diese Ergebnisse müßten in Zukunft noch reproduziert und validiert werden. Auch sollte MED26/CRSP70 als Marker für B-MED/CRSP in der Immunfluoreszenz dargestellt werden, um eine Assoziation mit dem Euchromatin mit unabhängigen Daten zu untermauern.

#### **4.5.4 Assoziation des Mediators mit dem SWI/SNF-Komplex**

Viele Untersuchungen haben Effekte des Mediator auf freier DNA demonstriert, so auch die Experimente in dieser Arbeit. In der Zelle übt der Mediator dagegen seine Funktionen in einer Chromatinumgebung aus. Sowohl die Mediator-Komplexe als auch die SWI-SNF-Chromatinumformungskomplexe (RSC und SWI/SNF in Hefe bzw. BAF/PBAF in Mammalia) regulieren die Expression der Mehrheit aller Gene in Hefe (Ng et al. 2002, Sudarsanam et al. 2000, Holstege et al. 1998) und wahrscheinlich auch in Metazoa. Sie sind daher häufig gemeinsam an Promotorregionen anzutreffen. Einige Faktoren binden sogar direkt Komplexe aus beiden Gruppen (Huang et al. 2003, Gwack et al. 2003, Neely et al. 2002, Bhoite et al. 2001).

Bisher ist unbekannt, ob die räumliche Nähe und die zeitnahe Rekrutierung von SWI/SNF und Mediator-Komplexen auch durch wechselseitige Interaktionen bedingt sind und ob diese Synergieeffekte in der Transkription zur Folge haben. Vereinzelt wurden Mediator und SWI/SNF zusammen mit Pol II und GTFs als Bestandteile eines Holoenzymes beschrieben (Wilson et al. 1996, Neish et al. 1998), doch ist es möglich, daß es sich hierbei z.T. um unspezifische Interaktionen zwischen diesen teils abundanten Zellkernproteinen handelte.

In dieser Arbeit dagegen wurden deutliche Hinweise auf eine direkte Interaktion gefunden, die ähnlich der schwachen Bindung des Mediators an Pol II relativ empfindlich gegenüber hohen Ionenstärken ist. Bisher führten Immunpräzipitationen mit den MED15-Antikörpern 6C9 und 1H7, sowie dem MED25-Antikörper 9C2 zur Copräzipitation des SWI/SNF-Komplexes. In der 2D-PAGE waren keine weiteren Faktoren zu erkennen, die als Bindeglied in einer indirekten Interaktion beider Komplexe hätten dienen können. Es ergaben sich auch keine Hinweise auf eine generelle Interaktion von Pol II mit dem SWI/SNF-Komplex, so daß neben der direkten Interaktion zwischen Mediator und SWI/SNF, nur ein ternärer Komplex die Beobachtungen erklären würde.

In der Zukunft sollte die Interaktion der Komplexe weiter validiert und charakterisiert werden. Ein wichtiger Beweis wäre die Coimmunpräzipitation des Mediators mittels eines SWI/SNF-Antikörpers. Wegen des großen Überschusses an SWI/SNF müßte eine entsprechende Menge Komplex aufgereinigt werden.

Interagierende Untereinheiten werden sich in Abwesenheit struktureller Daten über die Komplexe und aufgrund der Vielzahl von Polypeptiden in beiden Komplexen nur schwer identifizieren lassen. Sie ließen sich eingrenzen, wenn man die interaktionsfähigen Komplexe bestimmt und dabei zwischen B-MED/CRSP, MED/ARC-L bzw. BAF (BRG1 oder BRM als ATPase), PBAF unterscheidet. Dies könnte mit Hilfe der Massenspektrometrie oder spezifischen Antikörpern in der Immunpräzipitation / im Western Blot geschehen. Mit diesen Informationen könnten auch Aussagen über regulierte Gene sowie potentielle Mechanismen getroffen werden.

#### 4.5.5 Proteinbiochemische Analyse von Mediator-Komplexen

Für die Untersuchung der o.g. Subgruppen von Mediator-Komplexen und der Assoziation mit dem SWI/SNF-Komplex ist die Verwendung bzw. Entwicklung quantitativer Nachweismethoden unerlässlich. Als eine aussagekräftige Methode erwies sich die 2D-Gelelektrophorese, die die Darstellung eines Großteils der Mediator-Untereinheiten mit geringem Molekulargewicht ermöglicht. So wurden MED9/FLJ10193 und MED29/Intersex im Verlauf dieser Arbeit erstmals als Bestandteile des Mediator-Komplexes gefunden, aber zuerst von Sato und Mitarbeitern publiziert, die einen Ansatz auf Basis der LC-MS/MS gewählt hatten (Sato et al. 2003a, Tomomori-Sato et al. 2004, Sato et al. 2004). Im Gegensatz zu dieser massenspektrometrischen Methode erlauben ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese sowie der Western Blot auch eine Quantifizierung der Proteine.

Gegenüber den hier verwendeten silbergefärbten Gelen kann die Quantifizierung noch optimiert werden, etwa durch die Verwendung von Fluoreszenzfärbungen und der *In-vivo*-Markierung mittels  $^{35}\text{S}$ -Methionin als sensitivster „Proteinfärbung“.

Die Position der Proteine im 2D-Gel in Abhängigkeit von pI und elektrophoretischer Mobilität wurde in dieser Arbeit ermittelt und eine erneute Bestimmung im Massenspektrometer ist nicht mehr notwendig. Dies erlaubt die Anwendung der 2D-PAGE in Fragestellungen in denen nur geringe Mengen an Mediator isoliert werden können, etwa aus primären Zellen oder bei der Untersuchung von speziellen Mediator-Fraktionen.

Es wurden noch weiteren Proteine gefunden, die mit dem Mediator assoziiert sein könnten: hnRNPA2, das Bestandteil großer RNA-prozessierender Enzyme ist, Trim11, das offenbar Homomultimere bildet (Reymond et al. 2001), NF45, ein Transkriptionsfaktor und SEC13, ein Protein des Kernporenkomplexes (Enninga et al. 2003). Bisher gibt es keine Anhaltspunkte, die eines dieser Proteine mit dem Mediator in Verbindung bringen könnten. Selbst im Falle von NF45 ist es unwahrscheinlich, daß dieses Protein als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor mit einem Großteil der Mediator-Komplexe assoziiert ist.

Eine weitere Anwendung der 2D-Karte ist die Suche nach postrationalen Modifikationen der Mediator-Untereinheiten, über die in der Literatur bisher nichts beschrieben ist. Bereits im silbergefärbten 2D-Gel lassen sich Untereinheiten finden, die nicht als einheitliche Spots auftreten, so z.B. MED15, MED25, MED20/TRFP und insbesondere MED7 und MED17/TRAP80.

Gibt man  $^{32}\text{P}$ -Phosphat in das Kulturmedium beliebiger Zellen, werden Proteine bei Phosphorylierung radioaktiv markiert und können mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Insbesondere MED22/Surf5, MED20/TRFP, MED9/FLJ10193 und MED17/TRAP80 wurden in den Experimenten dieser Arbeit phosphoryliert.

MED7, das in 2D-Gelen mehrerer Aufreinigungen jeweils als doppelter Spot zu sehen ist, wurde nicht markiert und trägt daher wahrscheinlich eine andere posttranslationale Modifikation. Um einen zuverlässigen Nachweis über die Modifikationen zu bekommen, sollte bei zukünftigen Experimenten mit der *In-vivo*-Markierung unmarkierter Mediator aus Hela-Kernextrakt mit aufgetrennt werden, um zusätzlich eine Gesamtproteinfärbung durchführen zu können.

Über eine Funktion der Phosphorylierungen läßt sich nur spekulieren. Es ist möglich, daß der Mediator ähnlich dem SWI/SNF-Komplex (Sif et al. 1998), TFIID (Akoulitchew et al. 2000) oder Pol II (Gebara et al. 1997) in bestimmten Phasen der Mitose durch Phosphorylierung inaktiviert und aus dem kondensierten Chromatin verdrängt wird. Die Veränderungen, die durch die Induktion einzelner Signalwege induziert werden, hätten in jedem Fall moderatere Auswirkungen auf die Mediator-Funktion, wie z.B. eine Modulierung der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Aus der Reihe der phosphorylierten Untereinheiten wird nach bisherigem Kenntnisstand nur MED17/TRAP80 von Aktivatoren gebunden (Ito et al. 1999).

## 5 Zusammenfassung

Proteine leisten den entscheidenden Beitrag zur Struktur und Funktion der Zellen aller Lebewesen. Einen erheblichen Einfluß haben dabei die differentielle Expression, die Lokalisation, die Modifikation von Proteinen sowie Interaktionen mit anderen Proteinen und Makromolekülen - Parameter, die sich auch mit weitentwickelten genomischen Methoden nur unzureichend bestimmen lassen. Vieles spricht daher für eine Betrachtung des Proteoms, um den Zustand lebender Zellen zu beschreiben. Die höchst unterschiedlichen Abundanzen von Proteinen sowie ihre strukturelle und funktionale Vielfalt erschwerten bisher die Proteinanalytik und umfassende Analysen, vergleichbar mit denen der Makromoleküle DNA und mRNA, sind nicht in Sicht. Die Lösung des Problems kann es sein, gezielt funktionale Einheiten bzw. Gruppen von Proteinen zu untersuchen. Eine sehr bedeutende Untergruppe des Proteoms jeder Zelle ist das regulatorische Netzwerk, welches auf der Ebene der Transkription die Expression von Proteinen entscheidend mitbestimmt. Mit optimierten und neuen Methoden, die aufeinander aufbauen, sollte dieses funktionale Subproteom genauer betrachtet werden. Hierzu wurden Zellfraktionierungsprotokolle optimiert, um die Proteine des Zellkerns und des Chromatins anzureichern und in nachfolgenden Analysen verwenden zu können. Es wurden Antikörper gegen verbreitete, funktional relevante Peptidmotive generiert, um in zellulären Fraktionen die entsprechenden Gruppen von Proteinen genauer untersuchen zu können. Aufbauend auf dem Konzept der Motivantikörper wurde eine Färbemethode für Zellkernproteine mit Kernlokalisationssignal entwickelt. Schließlich wurde mit den Methoden der Zellfraktionierung und spezifischeren Antikörpertechniken eine Analyse des humanen Mediator-Komplexes der RNA Polymerase II unternommen, die zur Entdeckung neuer Untereinheiten, potentiell interagierender Proteine und Phosphorylierungen im Komplex führte. Ein offenbar spezifischer Mediator-Komplex aus Chromatin-Extrakt konnte in Ansätzen charakterisiert werden.

Mit allen Methoden konnten signalabhängige Prozesse beobachtet werden. So wurden mit den Motivantikörpern und insbesondere der Kernproteinfärbung mit dereprimiertem Importin alpha eine Vielzahl von differentiell exprimierten Proteinen im biologischen Prozeß der T-Zell-Aktivierung gefunden. Die Veränderungen in den primären T-Lymphocyten machten sich in einer erheblichen Steigerung der Proteinvielfalt des Zellkerns bemerkbar. Auch der Mediator-Komplex unterliegt

signalspezifischen und kompartimentspezifischen Veränderungen wie Phosphorylierungen oder der unterschiedlichen Assoziation von Untereinheiten. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung der C-terminalen Domäne (CTD) RNA Polymerase II nicht auf der fakultativen Untereinheit MED26 beruht, sondern auf der damit einhergehenden Abwesenheit eines Kinase-Submoduls. Diese Eigenschaft begründet die Aktivität dieser Komplexe in der basalen Transkription und wahrscheinlich auch in manchen Funktionen als Coaktivator. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit wird die CTD-Bindung in weiteren Untersuchungen voraussichtlich noch deutlicher mit den transkriptionsaktiven Mediator-Komplexen und der Assoziation mit dem Chromatin verknüpft werden können.

## 6 Literatur

- Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D** (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407:102-6
- Alberts B.** 2004. *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Aufl ed. Wiley-VCH, Weinheim ; Chichester.
- Allison LA, Moyle M, Shales M, Ingles CJ** (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* 42:599-610
- Anderson L, Seilhamer J** (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18:533-7
- Andrade R, Alonso R, Pena R, Arlucea J, Arechaga J** (2003). Localization of importin alpha (Rch1) at the plasma membrane and subcellular redistribution during lymphocyte activation. *Chromosoma* 112:87-95
- Asada S, Choi Y, Yamada M, Wang SC, Hung MC, Qin J, Uesugi M** (2002). External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12747-52
- Asturias FJ, Jiang YW, Myers LC, Gustafsson CM, Kornberg RD** (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283:985-7
- Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA** (1999). Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol* 13:1550-7
- Bauerle M, Doenecke D, Albig W** (2002). The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *J Biol Chem* 277:32480-9
- Bedford MT, Reed R, Leder P** (1998). WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10602-7
- Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC** (2004). Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:410-5
- Bhoite LT, Yu Y, Stillman DJ** (2001). The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev* 15:2457-69
- Blackwood EM, Kadonaga JT** (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281:61-3
- Blazek E, Mittler G, Meisterernst M** (2005). The Mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* (im Druck)
- Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA, Benham C** (2003). From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res* 11:435-45



- Bourbon HM, Aguilera A, Ansari AZ, Asturias FJ, Berk AJ, Bjorklund S, Blackwell TK, Borggrefe T, Carey M, Carlson M, Conaway JW, Conaway RC, Emmons SW, Fondell JD, Freedman LP, Fukasawa T, Gustafsson CM, Han M, He X, Herman PK, Hinnebusch AG, Holmberg S, Holstege FC, Jaehning JA, Kim YJ, Kuras L, Leutz A, Lis JT, Meisterernest M, Naar AM, Nasmyth K, Parvin JD, Ptashne M, Reinberg D, Ronne H, Sadowski I, Sakurai H, Sipiczki M, Sternberg PW, Stillman DJ, Strich R, Struhl K, Svejstrup JQ, Tuck S, Winston F, Roeder RG, Kornberg RD** (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* 14:553-7
- Bryan TM, Reddel RR** (1994). SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog* 5:331-57
- Burakov D, Wong CW, Rachez C, Cheskis BJ, Freedman LP** (2000). Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J Biol Chem* 275:20928-34
- Butler JE, Kadonaga JT** (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583-92
- Casadaban MJ, Cohen SN** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138:179-207.
- Chan DC, Bedford MT, Leder P** (1996). Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *Embo J* 15:1045-54
- Cokol M, Nair R, Rost B** (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 1:411-5
- Conaway JW, Shilatfard A, Dvir A, Conaway RC** (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25:375-80
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J** (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94:193-204
- Cooke A, Kay JE** (1973). Effect of phytohaemagglutinin on the nuclear RNA polymerase activity of human lymphocytes. *Exp Cell Res* 79:179-85
- Cosma MP, Panizza S, Nasmyth K** (2001). Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell* 7:1213-20
- Cramer P** (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12:89-97
- Cyert MS** (2001). Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* 276:20805-8
- Darst SA** (2001). Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* 11:155-62

- Davis JA, Takagi Y, Kornberg RD, Asturias FA** (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* 10:409-15
- Dikstein R, Ruppert S, Tjian R** (1996). TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell* 84:781-90
- Dotson MR, Yuan CX, Roeder RG, Myers LC, Gustafsson CM, Jiang YW, Li Y, Kornberg RD, Asturias FJ** (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14307-10
- Drane P, Barel M, Balbo M, Frade R** (1997). Identification of RB18A, a 205 kDa new p53 regulatory protein which shares antigenic and functional properties with p53. *Oncogene* 15:3013-24
- Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R** (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66:563-76
- Eberhardy SR, Farnham PJ** (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *J Biol Chem* 277:40156-62
- Eisen JA, Sweder KS, Hanawalt PC** (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23:2715-23
- Enenkel C, Blobel G, Rexach M** (1995). Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270:16499-502
- Enninga J, Levay A, Fontoura BM** (2003). Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 23:7271-84
- Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol M** (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* 272:32869-77
- Flanagan PM, Kelleher RJ, 3rd, Sayre MH, Tschochner H, Kornberg RD** (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350:436-8
- Fondell JD, Ge H, Roeder RG** (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8329-33
- Fontes MR, Teh T, Kobe B** (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- $\alpha$ . *J Mol Biol* 297:1183-94
- Frade R, Balbo M, Barel M** (2000). RB18A, whose gene is localized on chromosome 17q12-q21.1, regulates in vivo p53 transactivating activity. *Cancer Res* 60:6585-9

- Fukuoka M, Suetsugu S, Miki H, Fukami K, Endo T, Takenawa T** (2001). A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* 152:471-82
- Garrett-Engle CM, Siegal ML, Manoli DS, Williams BC, Li H, Baker BS** (2002). *intersex*, a gene required for female sexual development in *Drosophila*, is expressed in both sexes and functions together with *doublesex* to regulate terminal differentiation. *Development* 129:4661-75
- Ge H, Roeder RG** (1994). Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78:513-23
- Ge K, Guermah M, Yuan CX, Ito M, Wallberg AE, Spiegelman BM, Roeder RG** (2002). Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417:563-7
- Gebara MM, Sayre MH, Corden JL** (1997). Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription. *J Cell Biochem* 64:390-402
- Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P** (1996). Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87:227-39
- Goldstrohm AC, Albrecht TR, Sune C, Bedford MT, Garcia-Blanco MA** (2001). The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1. *Mol Cell Biol* 21:7617-28
- Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S** (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5:383-92
- Grunstein M** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349-52
- Guglielmi B, van Berkum NL, Klapholz B, Bijma T, Boube M, Boschiero C, Bourbon HM, Holstege FC, Werner M** (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32:5379-91
- Guidi BW, Bjornsdottir G, Hopkins DC, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Myers LC** (2004). Mutual targeting of mediator and the TFIIH kinase Kin28. *J Biol Chem* 279:29114-20
- Gwack Y, Baek HJ, Nakamura H, Lee SH, Meisterernst M, Roeder RG, Jung JU** (2003). Principal role of TRAP/mediator and SWI/SNF complexes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA-mediated lytic reactivation. *Mol Cell Biol* 23:2055-67
- Hanahan D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. IRL press at Oxford University press, Oxford, U.K.
- Harlow E, Lane D.** 1999. Using antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Hassan AH, Neely KE, Workman JL** (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104:817-27
- Hatzis P, Talianidis I** (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* 10:1467-77
- He DC, Nickerson JA, Penman S** (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol* 110:569-80
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS, Young RA** (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2:43-53
- Hittelman AB, Burakov D, Iniguez-Lluhi JA, Freedman LP, Garabedian MJ** (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* 18:5380-8
- Ho HY, Rohatgi R, Lebensohn AM, Le M, Li J, Gygi SP, Kirschner MW** (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118:203-16
- Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA** (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95:717-28
- Huang SY, Garrard WT** (1989). Electrophoretic analyses of nucleosomes and other protein-DNA complexes. *Methods Enzymol* 170:116-42
- Huang ZQ, Li J, Sachs LM, Cole PA, Wong J** (2003). A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *Embo J* 22:2146-55
- Imbalzano AN, Kwon H, Green MR, Kingston RE** (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370:481-5
- Ito M, Okano HJ, Darnell RB, Roeder RG** (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *Embo J* 21:3464-75
- Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S, Fu ZY, Zhang X, Qin J, Roeder RG** (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3:361-70
- Ito M, Yuan CX, Okano HJ, Darnell RB, Roeder RG** (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* 5:683-93
- Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT** (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90:145-55

- Izaurralde E, Kutay U, von Kobbe C, Mattaj IW, Gorlich D** (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* 16:6535-47
- Jans DA, Xiao CY, Lam MH** (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22:532-44
- Jenuwein T, Allis CD** (2001). Translating the histone code. *Science* 293:1074-80
- Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ** (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J* 18:6682-93
- Johnson KM, Carey M** (2003). Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. *Curr Biol* 13:772-7
- Johnson KM, Wang J, Smallwood A, Arayata C, Carey M** (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. *Genes Dev* 16:1852-63
- Kadonaga JT** (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34:259-64
- Kadonaga JT** (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116:247-57
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509
- Kang YK, Guermah M, Yuan CX, Roeder RG** (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2642-7
- Kassabov SR, Zhang B, Persinger J, Bartholomew B** (2003). SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell* 11:391-403
- Kato Y, Habas R, Katsuyama Y, Naar AM, He X** (2002). A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* 418:641-6
- Kato Y, Nagata K, Takahashi M, Lian L, Herrero JJ, Sudol M, Tanokura M** (2004). Common mechanism of ligand recognition by group II/III WW domains: redefining their functional classification. *J Biol Chem* 279:31833-41
- Kim TW, Kwon YJ, Kim JM, Song YH, Kim SN, Kim YJ** (2004). MED16 and MED23 of Mediator are coactivators of lipopolysaccharide- and heat-shock-induced transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12153-8
- Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD** (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:599-608

- Knapp S, Muller S, Digilio G, Bonaldi T, Bianchi ME, Musco G** (2004). The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry* 43:11992-7
- Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F, Meisterernst M** (1994a). A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78:525-34
- Kretzschmar M, Stelzer G, Roeder RG, Meisterernst M** (1994b). RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Mol Cell Biol* 14:3927-37
- Kuhn EJ, Geyer PK** (2003). Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 15:259-65
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lau JF, Nusinzon I, Burakov D, Freedman LP, Horvath CM** (2003). Role of metazoan mediator proteins in interferon-responsive transcription. *Mol Cell Biol* 23:620-8
- Lehman AM, Ellwood KB, Middleton BE, Carey M** (1998). Compensatory energetic relationships between upstream activators and the RNA polymerase II general transcription machinery. *J Biol Chem* 273:932-9
- Lin KT, Lu RM, Tarn WY** (2004). The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Cell Biol* 24:9176-85
- Lin YS, Carey M, Ptashne M, Green MR** (1990). How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously. *Nature* 345:359-61
- Logie C, Tse C, Hansen JC, Peterson CL** (1999). The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry* 38:2514-22
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-60
- Luger K, Richmond TJ** (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8:140-6
- Lusser A, Kadonaga JT** (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 25:1192-200
- Malik S, Gu W, Wu W, Qin J, Roeder RG** (2000a). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5:753-60

- Malik S, Gu W, Wu W, Qin J, Roeder RG** (2000b). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol. Cell* 5:753-60
- Malik S, Roeder RG** (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* 25:277-83
- Malik S, Wallberg AE, Kang YK, Roeder RG** (2002). TRAP/SMCC/mediator-dependent transcriptional activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 22:5626-37
- Marmorstein R, Berger SL** (2001). Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene* 272:1-9
- Martinez E** (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* 50:925-47
- Meininghaus M, Eick D** (1999). Requirement of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II for the transcriptional activation of chromosomal c-fos and hsp70A genes. *FEBS Lett* 446:173-6
- Meisterernst M, Roy AL, Lieu HM, Roeder RG** (1991). Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* 66:981-93
- Melen K, Fagerlund R, Franke J, Kohler M, Kinnunen L, Julkunen I** (2003). Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278:28193-200
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F** (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-63
- Mikulits W, Pradet-Balade B, Habermann B, Beug H, Garcia-Sanz JA, Mullner EW** (2000). Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. *Faseb J* 14:1641-52
- Mittler G, Kremmer E, Timmers HT, Meisterernst M** (2001). Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep* 2:808-13
- Mittler G, Stuhler T, Santolin L, Uhlmann T, Kremmer E, Lottspeich F, Berti L, Meisterernst M** (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *Embo J* 22:6494-504
- Miyamoto S, Kimball SR, Safer B** (2000). Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochim Biophys Acta* 1494:28-42
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD** (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87:1261-70

- Mo X, Kowenz-Leutz E, Xu H, Leutz A** (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* 13:241-50
- Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nasmyth K** (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66:743-58
- Moroianu J, Blobel G, Radu A** (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2008-11
- Myers LC, Gustafsson CM, Bushnell DA, Lui M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD** (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 12:45-54
- Myers LC, Kornberg RD** (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 69:729-49
- Naar AM, Beaurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R** (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12:3020-31
- Naar AM, Beaurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W, Tjian R** (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 398:828-32
- Naar AM, Lemon BD, Tjian R** (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70:475-501
- Naar AM, Taatjes DJ, Zhai W, Nogales E, Tjian R** (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* 16:1339-44
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R, Yoneda Y** (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* 10:2221-33
- Neely KE, Hassan AH, Brown CE, Howe L, Workman JL** (2002). Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol. Cell. Biol.* 22:1615-25.
- Neidhart JA** (1986). Interferon therapy for the treatment of renal cancer. *Cancer* 57:1696-9
- Neish AS, Anderson SF, Schlegel BP, Wei W, Parvin JD** (1998). Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* 26:847-53
- Nevado J, Tenbaum SP, Aranda A** (2004). hSrb7, an essential human Mediator component, acts as a coactivator for the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 222:41-51



- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K** (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev* 16:806-19
- Nie Z, Xue Y, Yang D, Zhou S, Deroo BJ, Archer TK, Wang W** (2000). A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol* 20:8879-88
- Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T** (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* 16:5433-44
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D** (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16:479-89
- Nonet ML, Young RA** (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123:715-24
- Nossal GJ** (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-39
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D** (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10:2657-83
- Park JM, Kim JM, Kim LK, Kim SN, Kim-Ha J, Kim JH, Kim YJ** (2003). Signal-induced transcriptional activation by Dif requires the dTRAP80 mediator module. *Mol Cell Biol* 23:1358-67
- Park JM, Werner J, Kim JM, Lis JT, Kim YJ** (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell* 8:9-19
- Peterson CL, Laniel MA** (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14:R546-51
- Pineda Torra I, Freedman LP, Garabedian MJ** (2004). Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 279:36184-91
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ** (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108:501-12
- Pugh BF, Tjian R** (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61:1187-97
- Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP** (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398:824-8
- Rani PG, Ranish JA, Hahn S** (2004). RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol Cell Biol* 24:1709-20

- Ranish JA, Yudkovsky N, Hahn S** (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev* 13:49-63
- Reyes JC, Muchardt C, Yaniv M** (1997). Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* 137:263-74
- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A** (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* 20:2140-51
- Rheinnecker M, Hardt C, Ilag LL, Kufer P, Gruber R, Hoess A, Lupas A, Rottenberger C, Pluckthun A, Pack P** (1996). Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol* 157:2989-97
- Ribbeck K, Gorlich D** (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* 21:2664-71
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C** (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64:615-23
- Roeder RG** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21:327-35
- Rose SM, Garrard WT** (1984). Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem* 259:8534-44
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R** (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397:446-50
- Samuelsen CO, Baraznenok V, Khorosjutina O, Spahr H, Kieselbach T, Holmberg S, Gustafsson CM** (2003). TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6422-7
- Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CA, Parmely TJ, Sorokina I, Brower CS, Conaway RC, Conaway JW** (2003a). A mammalian homolog of *Drosophila melanogaster* transcriptional coactivator intersex is a subunit of the mammalian Mediator complex. *J Biol Chem* 278:49671-4
- Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CA, Sorokina I, Parmely TJ, Kong SE, Jin J, Cai Y, Lane WS, Brower CS, Conaway RC, Conaway JW** (2003b). Identification of mammalian Mediator subunits with similarities to yeast Mediator subunits Srb5, Srb6, Med11, and Rox3. *J Biol Chem* 278:15123-7

- Sato S, Tomomori-Sato C, Parmely TJ, Florens L, Zybaylov B, Swanson SK, Banks CA, Jin J, Cai Y, Washburn MP, Conaway JW, Conaway RC** (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14:685-91
- Satoh S, Tominaga T** (2001). mDia-interacting protein acts downstream of Rho-mDia and modifies Src activation and stress fiber formation. *J Biol Chem* 276:39290-4
- Sawadogo M, Roeder RG** (1985). Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4394-8
- Schreiber V, Molinete M, Boeuf H, de Murcia G, Menissier-de Murcia J** (1992). The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *Embo J* 11:3263-9
- Shimogawa H, Kwon Y, Mao Q, Kawazoe Y, Choi Y, Asada S, Kigoshi H, Uesugi M** (2004). A wrench-shaped synthetic molecule that modulates a transcription factor-coactivator interaction. *J Am Chem Soc* 126:3461-71
- Sif S, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kingston RE** (1998). Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* 12:2842-51
- Stevens JL, Cantin GT, Wang G, Shevchenko A, Berk AJ** (2002). Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 296:755-8
- Strahl BD, Allis CD** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-5
- Studier FW, Moffatt BA** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-30.
- Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F** (2000). Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3364-9.
- Sun X, Zhang Y, Cho H, Rickert P, Lees E, Lane W, Reinberg D** (1998a). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol Cell* 2:213-22
- Sun X, Zhang Y, Cho H, Rickert P, Lees E, Lane W, Reinberg D** (1998b). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol. Cell* 2:213-22
- Suzuki Y, Nogi Y, Abe A, Fukasawa T** (1988). GAL11 protein, an auxiliary transcription activator for genes encoding galactose-metabolizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8:4991-9
- Sweetser D, Nonet M, Young RA** (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1192-6

- Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R** (2004). Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:403-10
- Taatjes DJ, Naar AM, Andel F, 3rd, Nogales E, Tjian R** (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295:1058-62
- Tagawa T, Kuroki T, Vogt PK, Chida K** (1995). The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal. *J Cell Biol* 130:255-63
- Tani K, Sato S, Sukezane T, Kojima H, Hirose H, Hanafusa H, Shishido T** (2003). Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J Biol Chem* 278:21685-92
- Teague TK, Hildeman D, Kedl RM, Mitchell T, Rees W, Schaefer BC, Bender J, Kappler J, Marrack P** (1999). Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12691-6
- Thomas JO** (2001). HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 29:395-401
- Thompson CM, Koleske AJ, Chao DM, Young RA** (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73:1361-75
- Thompson NE, Steinberg TH, Aronson DB, Burgess RR** (1989). Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J Biol Chem* 264:11511-20
- Tikoo K, Gupta S, Hamid QA, Shah V, Chatterjee B, Ali Z** (1997). Structure of active chromatin: isolation and characterization of transcriptionally active chromatin from rat liver. *Biochem J* 322 ( Pt 1):273-9
- Tomomori-Sato C, Sato S, Parmely TJ, Banks CA, Sorokina I, Florens L, Zybaylov B, Washburn MP, Brower CS, Conaway RC, Conaway JW** (2004). A mammalian mediator subunit that shares properties with *Saccharomyces cerevisiae* mediator subunit Cse2. *J Biol Chem* 279:5846-51
- Toth JI, Datta S, Athanikar JN, Freedman LP, Osborne TF** (2004). Selective coactivator interactions in gene activation by SREBP-1a and -1c. *Mol Cell Biol* 24:8288-300
- Troelstra C, van Gool A, de Wit J, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH** (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71:939-53
- Tudyka T, Skerra A** (1997). Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* 6:2180-7

- Ueda T, Chou H, Kawase T, Shirakawa H, Yoshida M** (2004). Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation. *Biochemistry* 43:9901-8
- Volkman BF, Prehoda KE, Scott JA, Peterson FC, Lim WA** (2002). Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* 111:565-76
- Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S** (2004). BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23:6000-5
- Wang G, Berk AJ** (2002). In vivo association of adenovirus large E1A protein with the human mediator complex in adenovirus-infected and -transformed cells. *J Virol* 76:9186-93
- Wang J, Ellwood K, Lehman A, Carey MF, She ZS** (1999). A mathematical model for synergistic eukaryotic gene activation. *J Mol Biol* 286:315-25
- Wang Q, Sharma D, Ren Y, Fondell JD** (2002). A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* 277:42852-8
- Wang S, Ge K, Roeder RG, Hankinson O** (2004). Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 279:13593-600
- Wang W** (2003). The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 274:143-69
- Wang W, Cote J, Xue Y, Zhou S, Khavari PA, Biggar SR, Muchardt C, Kalpana GV, Goff SP, Yaniv M, Workman JL, Crabtree GR** (1996). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* 15:5370-82
- Warnmark A, Almlof T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E** (2001). Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 276:23397-404
- Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S** (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* 16:3044-56
- West ML, Corden JL** (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* 140:1223-33
- Wilson CJ, Chao DM, Imbalzano AN, Schnitzler GR, Kingston RE, Young RA** (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84:235-44
- Wu SY, Zhou T, Chiang CM** (2003). Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol* 23:6229-42

- Xue Y, Canman JC, Lee CS, Nie Z, Yang D, Moreno GT, Young MK, Salmon ED, Wang W** (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13015-20
- Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W** (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2:851-61
- Yang F, DeBeaumont R, Zhou S, Naar AM** (2004). The activator-recruited cofactor/Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2339-44
- Yoneda Y** (2000). Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes Cells* 5:777-87
- Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG** (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7939-44
- Yudkovsky N, Ranish JA, Hahn S** (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408:225-9
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA** (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* 2003:RE8
- Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, Polakiewicz RD, Comb MJ** (2002). Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J Biol Chem* 277:39379-87
- Zhou R, Bonneaud N, Yuan CX, de Santa Barbara P, Boizet B, Schomber T, Scherer G, Roeder RG, Poulat F, Berta P, Tibor S** (2002). SOX9 interacts with a component of the human thyroid hormone receptor-associated protein complex. *Nucleic Acids Res* 30:3245-52
- Zhu Y, Qi C, Jain S, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Atkins GB, Lazar MA, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK** (1999). Amplification and overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor binding protein (PBP/PPARBP) gene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10848-53
- Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK** (1997). Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272:25500-6

## 7 Anhang

### 7.1 Aminosäuren-Tabelle (Ein- und Drei-Buchstaben-Code)

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### 7.2 Poly-(Aspartat/Glutamat)-Proteine im menschlichen Proteom

**Tabelle 5.2 Proteine aus Uniprot mit mindestens 15 Aspartat/Glutamat-Resten in ununterbrochener Folge**

Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein	251	Q6NS40	Hypothetical protein.	200
Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein	268	Q6P049	Hypothetical protein.	526
Q8TEY4	Adaptor protein FE65a2 (Fragment).	712	O94957	KIAA0881 protein (Fragment).	1064
Q8TCU4	ALMS1 protein.	4169	Q6NVJ6	KIAA1115 protein (Fragment).	849
Q15911	Alpha-fetoprotein enhancer binding protein	3703	Q96ID3	KIAA1115 protein (Fragment).	243
O00213	Amyloid beta A4 precursor protein-binding	710	Q9ULL8	KIAA1202 protein (Fragment).	1502
Q71U10	Amyloid protein homolog HSD-2.	763	Q9HCE9	KIAA1623 protein (Fragment).	1236
Q06481	Amyloid-like protein 2 precursor (Amyloid	763	Q9C0F2	KIAA1711 protein (Fragment).	1090
O73453	APM-1 protein.	619	Q96JJ2	KIAA1835 protein (Fragment).	623
Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer	1341	Q96JH2	KIAA1855 protein (Fragment).	1270
Q6P528	ASPEN protein.	384	Q8TF50	KIAA1951 protein (Fragment).	679
Q9BXN1	Asporin precursor (Periodontal ligament	379	Q6PL18	L16.	1390
Q6SPF0	Atherin.	538	Q9BQF9	Lipid phosphate phosphatase-related protein	746
Q9H4G2	BA119E20.1 (KIAA1202 protein)	1454	Q8IUK4	LMOD3 protein.	236
Q6PK06	BAT8 protein (Fragment).	1209	Q6PIS7	LOC90378 protein (Fragment).	295
Q9H165	B-cell lymphoma/leukemia 11A (B-cell	835	Q96IM4	LOC90378 protein (Hypothetical protein)	236
Q13861	Binding protein (Fragment).	695	P07199	Major centromere autoantigen B (Centromere	599
Q14662	Binding protein (Fragment).	669	Q86VW5	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting	824
Q6P3U2	BRD2 protein.	836	Q01538	Myelin transcription factor 1 (MYT1) (MYTI)	1121
Q9NYU3	Breast carcinoma-associated antigen	873	Q9UL68	Myelin transcription factor 1-like.	1192
Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger	1972	Q8WU81	MYST4 protein (Fragment).	887
Q9UIG0	Bromodomain adjacent to zinc finger	1483	Q9BQ02	NCL protein.	482
P25440	Bromodomain-containing protein 2 (RING3	801	Q9NNW1	Neuronal phosphoprotein DARPP-32	98
Q86X92	C20orf6 protein (Fragment).	595	Q9BTI9	NPM1 protein.	214
Q6IPP2	C9orf75 protein (Fragment).	487	P17480	Nucleolar transcription factor 1 (Upstream	764
Q8IZ53	C9orf75 protein (Fragment).	380	P19338	Nucleolin (Protein C23).	706
Q9UMG2	CGMP-gated cation channel beta subunit.	1251	P06748	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar	294
Q6P5Q1	Chromosome 14 open reading frame 37.	231	Q6V962	Nucleophosmin.	294
Q13387	C-jun-amino-terminal kinase interacting	824	Q9BYG9	Nucleophosmin/B23.2.	259
Q14028	Cyclic-nucleotide-gated cation channel 4	909	P12270	Nucleoprotein TPR.	2349
P35659	DEK protein.	375	Q9BR60	OS-9 protein (Fragment).	373
Q9NQJ4	DJ579F20.1 (High-mobility group	211	Q6IBL2	OS-9 protein.	612

Q9UD71	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal	204	Q86XQ4	PAP-2-like protein 2.	719
Q9NXZ4	ELG protein.	340	Q96FT1	PELP1 protein (Fragment).	1048
O15371	Eukaryotic translation initiation factor 3	548	Q9BU60	PELP1 protein (Fragment).	743
O60841	Eukaryotic translation initiation factor 5B	1220	O15450	PELP1.	1284
Q86X90	F-box only protein 3, isoform 1.	471	Q86YN6	PPAR gamma coactivator 1beta-1a.	1023
Q9UK99	F-box only protein 3.	471	Q86YN5	PPAR gamma coactivator 1beta-1b.	1017
Q9H7N4	FLJ00034 protein (Fragment).	1343	Q86YN4	PPAR gamma coactivator 1beta-2a.	1002
Q9Y4W2	FLJ12525 protein.	717	Q86YN3	PPAR gamma coactivator 1beta-2b.	996
Q86TY3	Full-length cDNA clone CS0DC025YL05 of	774	Q8TDE4	PGC-1-related estrogen receptor alpha	984
P09429	High mobility group protein 1 (HMG-1).	214	Q8TDE5	PGC-1-related estrogen receptor alpha	1023
Q9UGV6	High mobility group protein 1-like 10	211	Q6T4P5	Plasticity related gene 2a.	718
P26583	High mobility group protein 2 (HMG-2).	208	P22459	Potassium voltage-gated channel subfamily A	653
Q9UKX0	Histone acetyltransferase MORF	1781	Q8TAL0	PPARGC1B protein (Fragment).	741
Q9UKW3	Histone acetyltransferase MORF alpha.	1890	Q13029	PR-domain zinc finger protein 2	1719
Q9UKW2	Histone acetyltransferase MORF beta.	2073	O15451	Proline and glutamic acid rich nuclear protein	1021
Q8WYB5	Histone acetyltransferase MOZ2.	2072	Q6NTE6	Proline-, glutamic acid-, leucine-rich protein	1130
Q96KQ7	Histone-lysine N-methyltransferase, H3	1210	Q9UL54	Prostate derived STE20-like kinase PSK.	1235
Q14321	HMG-1.	215	P13667	Protein disulfide-isomerase A4 precursor (EC	645
Q6IBE1	HMGb1 protein.	215	Q8N2W9	Protein inhibitor of activated STAT protein 4	510
Q8IX15	Homeobox-leucine zipper protein Homez	525	Q9UPN7	Protein KIAA1115.	754
Q7L406	HSA277841 protein (Fragment).	334	Q13438	Protein OS-9 precursor.	667
Q6P0R3	Hypothetical protein (Fragment).	285	Q96MU7	Putative splicing factor YT521.	727
Q8WVA1	Hypothetical protein (Fragment).	483	P46060	Ran GTPase-activating protein 1.	587
Q96EI4	Hypothetical protein (Fragment).	138	Q9P2W4	RBP1-like protein.	803
Q9BSK3	Hypothetical protein (Fragment).	213	Q9NQC3	Reticulon 4 (Neurite outgrowth inhibitor)	1192
Q9H501	Hypothetical protein C20orf6.	851	Q96B16	Reticulon 4, isoform D (RTN4 isoform B2).	392
Q658Y7	Hypothetical protein DKFZp313H139.	681	O00164	Ribosomal RNA upstream binding	654
Q9NSW2	Hypothetical protein DKFZp434N1427.	1062	Q969K3	RING finger protein RIFF (Fragment).	372
Q659A2	Hypothetical protein DKFZp451K134.	1258	O43636	Rod photoreceptor CNG-channel beta	1245
Q9H0V2	Hypothetical protein DKFZp564B092.	471	Q6IPN0	RTN4 protein.	343
Q658P2	Hypothetical protein DKFZp667N1320	1344	P23327	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-	699
Q63HQ9	Hypothetical protein DKFZp686N0336.	754	Q9H4L4	Sentrin-specific protease 3 (EC 3.4.22.-)	574
Q69YI2	Hypothetical protein DKFZp762O059	461	Q9NR59	Ser/arg-rich pre-mRNA splicing factor SR-A1.	1312
Q68CQ0	Hypothetical protein DKFZp781K1122.	412	Q7Z5V7	Serine arginine-rich pre-mRNA splicing factor	1312
Q9HAJ4	Hypothetical protein FLJ11535.	326	Q86UX1	SIN3A-associated protein 180.	1312
Q9HAF9	Hypothetical protein FLJ11703.	347	Q7LC09	STE20-like kinase (Fragment).	1049
Q9H9V5	Hypothetical protein FLJ12525	734	O60706	Sulfonylurea receptor 2.	1549
Q6ZN62	Hypothetical protein FLJ16400.	268	Q86V37	TAO1 protein (Fragment).	1426
Q9NXK9	Hypothetical protein FLJ20187.	243	Q86XI4	TATA box binding protein-associated factor,	462
Q9NX34	Hypothetical protein FLJ20465.	179	Q9BXU5	TBP-associated factor II Q.	374
Q9H6W8	Hypothetical protein FLJ21786.	372	Q9Y5Q9	TFIIIC 102 kDa subunit	886
Q96LS4	Hypothetical protein FLJ25123.	348	Q9Y5Q8	TFIIIC 63 kDa subunit	519
Q96N57	Hypothetical protein FLJ31386.	671	Q8WYN3	TGF-beta induced apoptosis protein 2 (TAIP-	585
Q8NB06	Hypothetical protein FLJ34423.	687	P46100	Transcriptional regulator ATRX (X-linked	2492
Q8N1N9	Hypothetical protein FLJ38072.	1023	Q8N5A0	Translation initiation factor IF2.	1220
Q8N890	Hypothetical protein FLJ39814.	978	O00294	Tubby related protein 1 (Tubby-like protein	542
Q8N7S5	Hypothetical protein FLJ40406.	390	Q8N571	TULP1 protein.	489
Q6ZUV1	Hypothetical protein FLJ43303.	435	O60840	Voltage-dependent L-type calcium channel	1966
Q6ZTX3	Hypothetical protein FLJ44141.	347	O95226	Voltage-gated L-type calcium channel alpha-	1912
Q6ZS99	Hypothetical protein FLJ45706.	603	Q9UHB1	Voltage-gated L-type calcium channel alpha-	1977
Q8NCH2	Hypothetical protein FLJ90254.	433	Q9P1Z0	Zinc finger and BTB domain containing	1013
Q8NG47	Hypothetical protein hRFI.	373	Q96E24	Zinc finger protein 526.	670

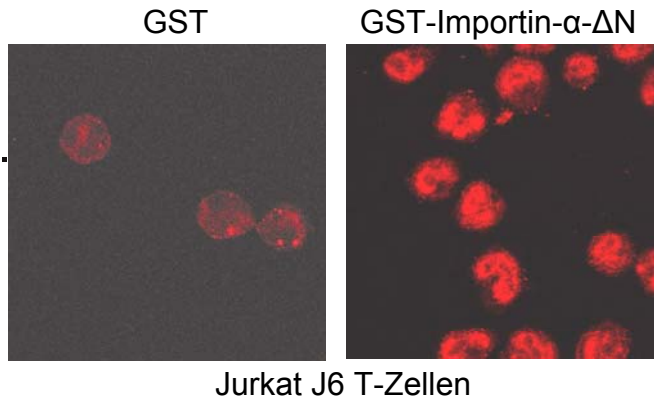


### 7.3 Polyprolin-Proteine im menschlichen Proteom

**Tabelle 5.1 Proteine aus Uniprot mit mindestens 10 Prolin-Resten in ununterbrochener Folge**

Q15911	Alpha-fetoprotein enhancer binding protein	3703	Q9UPQ2	KIAA1100 protein (Fragment).	444
O14514	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	1584	Q9ULL5	KIAA1205 protein (Fragment).	1217
Q8TDH1	CLL-associated antigen KW-13	991	Q9P2B8	KIAA1429 protein (Fragment).	1795
Q8N144	Connexin 31.9.	294	Q9C0I2	KIAA1681 protein (Fragment).	1236
Q6VEQ4	CXYorf1.	264	Q9C0F0	KIAA1713 protein (Fragment).	1652
Q86TK9	CXYorf1-related protein.	468	Q9C0D6	KIAA1727 protein (Fragment).	1130
O60610	Diaphanous protein homolog 1	1248	Q9C0C0	KIAA1743 protein (Fragment).	1036
Q9NSV4	Diaphanous protein homolog 3	853	Q96PY5	KIAA1902 protein (Fragment).	1112
Q9Y2W9	Endocrine regulator.	2099	Q8TF30	KIAA1971 protein (Fragment).	830
Q9H7I8	FLJ00096 protein (Fragment).	208	P46379	Large proline-rich protein BAT3 (HLA-B-	1132
Q6P447	FLJ25222 protein.	264	Q86UH1	Leukocyte formin.	1100
Q8N3X1	Formin binding protein 4.	1015	Q86VE0	LOC339344 protein (Fragment).	428
Q9Y661	Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-4	456	Q6XYB2	LP2654.	288
Q8TEK3	Histone-lysine N-methyltransferase, H3	1739	Q7RTP7	MICAL2 (Fragment).	567
Q9BCN4	HLA-B associated transcript-3, isoform b.	1126	Q9Y6R4	Mitogen-activated protein kinase kinase	1607
P17483	Homeobox protein Hox-B4 (Hox-2F) (Hox-	251	Q8IXH4	MSTP054.	1141
P42858	Huntingtin (Huntington's disease protein)	3144	O00401	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-	505
Q6DKG5	Hypothetical protein	682	P58401	Neurexin 2-beta precursor (Neurexin II-beta).	666
Q8ND05	Hypothetical protein DKFZp434F1431	354	Q96SE1	NGAP-like protein.	1065
Q9H0K1	Hypothetical protein DKFZp434K1115.	926	Q7Z5Z9	NPC-A-5.	20
Q9NT81	Hypothetical protein DKFZp434M2023	1013	Q9Y6V0	Piccolo protein (Aczonin).	5183
Q6MZFO	Hypothetical protein DKFZp686A13178	669	Q86XR5	Proline rich membrane anchor 1 precursor	153
Q68CP0	Hypothetical protein DKFZp686B2325	2403	Q8N3W4	Protein phosphatase 3 catalytic subunit beta3	515
Q69YN4	Hypothetical protein DKFZp686C1522.	1810	Q7Z7A4	PX serine/threonine kinase.	578
Q63HJ5	Hypothetical protein DKFZp686L2367.	2506	Q8IW32	R3H domain (Binds single-stranded nucleic	1099
Q8N3E0	Hypothetical protein DKFZp761P0824	1009	Q15032	R3H domain protein 1.	971
Q7Z666	Hypothetical protein DKFZp779I1064	270	Q7Z7F9	RANBP9 protein (Fragment).	802
Q7Z3K9	Hypothetical protein DKFZp781L0540	799	Q96S59	RanBPM.	729
Q9H985	Hypothetical protein FLJ12925.	560	Q70E73	RAPH1 protein.	1250
Q96JU6	Hypothetical protein FLJ14966.	509	Q7L0R7	Ring finger protein 44.	432
Q6ZN29	Hypothetical protein FLJ16492.	907	Q9Y467	Sal-like protein 2 (Zinc finger protein SALL2)	1007
Q6ZMW8	Hypothetical protein FLJ16624.	1103	Q9NTN9	Semaphorin 4G precursor.	838
Q9NXB8	Hypothetical protein FLJ20335.	649	P78362	Serine kinase SRPK2.	686
Q96MU3	Hypothetical protein FLJ31888.	568	P16299	Serine/threonine protein phosphatase 2B	524
Q8N279	Hypothetical protein FLJ33811.	1077	Q9BWD2	SF3B2 protein (Fragment).	894
Q8NB24	Hypothetical protein FLJ34364.	749	Q6V1X2	SFRS protein kinase 2 isoform c.	546
Q8NAV4	Hypothetical protein FLJ34705.	699	Q8IYQ3	SFRS protein kinase 2, isoform b.	688
Q8N9B5	Hypothetical protein FLJ37870.	634	Q6AZE2	SIK2 protein (Fragment).	711
Q8N1J9	Hypothetical protein FLJ40628.	209	Q8TAJ6	Similar to KIAA1076 protein (Fragment).	469
Q6ZW33	Hypothetical protein FLJ41677.	520	Q6NTF6	SP5 protein (Fragment).	396
Q6ZS14	Hypothetical protein FLJ45904.	1063	Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	872
Q6ZQN3	Hypothetical protein FLJ46838.	121	Q6NUL0	SRPK2 protein.	688
Q7Z746	Hypothetical protein WASL.	505	Q16637	Survival motor neuron protein	294
Q9UNU8	Hypothetical protein.	2099	Q6BEB4	Trans-acting transcription factor 5.	398
O14654	Insulin receptor substrate 4	1257	Q9Y4A5	Transformation/transcription domain-	3859
O15047	KIAA0339 protein (Fragment).	1709	Q70EK9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 51	711
O15054	KIAA0346 protein (Fragment).	1682	P42768	Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp).	501
Q76N03	KIAA0781 protein (Fragment).	950	O75221	WUGSC:H_RG152G17.1b protein	675
Q9Y2L7	KIAA1014 protein (Fragment).	1050	Q86UP3	Zinc finger homeodomain 4 protein.	3567
Q9UPV1	KIAA1051 protein (Fragment).	402	Q96T25	Zinc finger protein ZIC 5 (Zinc finger protein	639
Q9UPT8	KIAA1064 protein (Fragment).	1315	Q96PN7	Zinc finger transcription factor TReP-132	1200

#### 7.4 Spezifische Färbung von Zellkernproteinen mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N



**Abbildung 5-1:** Jurkat-Zellen wurden in einem der Immunfluoreszenz analogen Verfahren mit GST-Importin- $\alpha$ - $\Delta$ N angefärbt. Die Zellkerne sind deutlich zu erkennen. GST bewirkt dagegen eine schwache Negativfärbung der Kerne.

# LEBENS LAUF

---

## P E R S Ö N L I C H E   D A T E N

Name	Erik Blazek
Geburtsdatum	29. November 1975
Geburtsort	Wolfenbüttel
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

## A U S B I L D U N G

03/2001 - 12/2004	<b>Promotionsstudium</b> an der Ludwig-Maximilians-Universität München »Biochemische Darstellung funktionaler Subproteome und großer Proteinkomplexe« GSF - Forschungszentrum, München PD Dr. Michael Meisterernst
10/1995 - 01/2001	<b>Studium der Biotechnologie</b> (Diplom) an der TU Braunschweig
11/1999 - 07/2000	<b>Diplomarbeit:</b> »Oncogenic Transformation by Jun Dimerization Protein 2« Scripps Research Institute, La Jolla, USA Prof. Dr. Peter K. Vogt
1998	<b>Studienarbeit:</b> »Untersuchungen an Oberflächenproteinen von <i>S. pneumoniae</i> « Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig Prof. Dr. G. Singh Chhatwal
1997	<b>Vordiplom</b>

## S C H U L B I L D U N G

1993 - 1995	Gymnasium Große Schule in Wolfenbüttel: <b>Abitur</b>
1992 - 1993	Michigan Center High-School, USA: <b>High-School-Abschluß</b>
1988 - 1992	Gymnasium Große Schule in Wolfenbüttel
1986 - 1988	Orientierungsstufe Wallstraße in Wolfenbüttel
1982 - 1986	Grundschule am Geitelplatz in Wolfenbüttel